

**„Die Redoxsensitivität des humanen La Protein (SS-B):
Analysen zu deren Einfluss auf Proteinstruktur, Funktion,
Antigenität und Zelllokalisierung“**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biologin t.o. Irene Michalk (geb. Thurow),
geboren am 14.11.1984 in Meißen

eingereicht am 15.09.2015

Die Dissertation wurde in der Zeit von April 2010 bis
September 2015 im Institut für Immunologie bzw. am Universitäts-KrebsCenter,
Abteilung für Tumorummunologie, angefertigt.

Erstgutachter

Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinz van Pée

Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie
Professur für Allgemeine Biochemie
TU Dresden, 01062 Dresden

Zweitgutachter

Prof. Dr. med. habil. Marc Schmitz

Institut für Immunologie, TU Dresden
Medizinische Fakultät "Carl Gustav Carus"
Fetscherstraße 74, 01307 Dresden

I. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. K.-H. van Pée des Instituts für Biochemie der Technischen Universität Dresden möchte ich mich für die Erstellung des Erstgutachtens vielmals bedanken. Für die Erstellung des Zweitgutachtens und die gute Kooperation danke ich Herrn Prof. Dr. M. Schmitz vom Institut für Immunologie der TU Dresden.

Für das Überlassen des interessanten und vielseitigen Themas danke ich Herrn Prof. Dr. M. Bachmann. Weiterhin möchte ich mich für die gute wissenschaftliche Betreuung und die anregenden Diskussionen bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Bachmann und des Instituts für Immunologie, die stets für eine gute, freundliche und liebevolle Arbeitsatmosphäre inklusive verlässlicher Zusammenarbeit und unermüdlicher Hilfsbereitschaft sorgten, besonders: Christine Gräfe, Barbara Uteß, Livia Schulze, Dr. Anja Feldmann, Dr. Marc Cartellieri, Dr. Slava Stamova, Dr. Holger Bartsch, Dr. Claudia Arndt, Stefanie Koristka, Florian Ludwig und Sebastian Gärtner.

Darüber hinaus danke ich unseren Kooperationspartnern: Prof. Dr. M. Schmitz, Dr. Rebekka Wehner und deren Kollegen (Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät, TU Dresden); Prof. Dr. Fahmy und Kollegen (Abteilung für Biophysik, Helmholtz Zentrum Dresden Rossendorf), sowie Prof. Dr. Morawitz, Dr. Coy Brunßen und deren Kollegen (Bereich für Gefäßendothel/Mikrozirkulation, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden).

Ein großes und herzliches Dankeschön für entgegengebrachte Liebe, stetige Motivation und Unterstützung gilt meinem Ehegatten Manuel, meinen Eltern und meiner Freundin Doreen.

II. Zusammenfassung

Vor zirka 45 Jahren wurde das La Protein (SS-B) erstmals als Autoantigen von Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) oder Primären Sjögren's Syndrom beschrieben. Jahrzehntelange Forschungen befassten sich mit seiner Struktur- und Funktionsaufklärung, sowie der Untersuchung von monoklonalen *anti*-La Antikörpern (*anti*-La mAK). Doch noch immer werfen nukleäre Antigene wie das La Protein und die gegen sie gerichteten Autoantikörper verschiedene Fragen auf. Diese betreffen besonders deren Entstehung und die pathophysiologische Bedeutung. So war es die Zielsetzung dieser Arbeit, die pathophysiologische Bedeutung des La Proteins in der Autoimmunkrankheit und der Krankheitsentstehung bei SLE-Patienten weiter aufzuklären. Im Zentrum der Untersuchungen stand dabei die Redoxsensitivität des La Proteins und deren Einfluss auf die räumliche Proteinstruktur, die zelluläre Lokalisation, die Funktion der Nukleinsäurebindung, sowie die Antigenität. Dabei konnte erstmals mit Hilfe von CD-Spektroskopieanalysen deutlich gezeigt werden, dass die drei Cysteine (C₁₈, C₂₃₂ und C₂₄₅) des La Proteins für die Struktur eine zentrale Rolle spielen. Es konnte demonstriert werden, dass die Fähigkeit zur redoxabhängigen Strukturumfaltung zum Verlust der protektiven Wirkung des La Proteins auf gebundene Nukleinsäure führt, wodurch diese für Nukleasen zugänglich gemacht wird und abgebaut werden kann. Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe verschiedener Experimente verifizieren, beispielsweise durch die Anwesenheit von Kupferionen (Cu²⁺), oder auch durch die Änderung des pH-Wertes von 7,0 auf 4,5. Parallel hierzu wurden neben Wildtyp La Protein auch verschiedene Cysteinmutanten getestet, um die Redoxabhängigkeit auch durch den Austausch der Cysteine C₁₈, C₂₃₂ und C₂₄₅ zu zeigen.

Die Änderungen des Redoxzustands beeinflussten jedoch nicht nur Sekundär- und Tertiärstruktur des La Proteins, sondern auch sein Di- und Oligomerisationsverhalten, sowie die Antigenerkennung durch bestimmte *anti*-La mAK (mAK der 312B Gruppe). Erstmals konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass Patientenautoantikörper nicht nur gegen die normalerweise nukleär vorliegende, reduzierte Form des La Proteins existieren. Es waren ebenso Patientenautoantikörper gegen die zytoplasmatische, oxidierte Form nachweisbar.

Auch auf zellulärer Ebene wurde die Wirkung einer redoxabhängigen Umfaltung des La Proteins deutlich. Durch den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) konnte eine zytoplasmatische Anreicherung beobachtet werden. Die dazu bereits bekannten Daten aus der Literatur konnten mit dieser Arbeit nochmals belegt und darüber hinaus ergänzt werden. Die zytoplasmatische Anreicherung wurde in der vorliegenden Arbeit für verschiedene ROS Stimuli gezeigt, darunter H₂O₂, Cu(II)SO₄, Fe(II)Cl₂ und darüber hinaus auch für NO-Glutathion (Stimulus reaktiver Stickstoffspezies NO). Des Weiteren konnte erstmals eine

zytoplasmatische La Anreicherung durch eine Veränderung des intrazellulären ROS Levels nach Rezeptorstimulation gezeigt werden. Spannender Weise gelang dies für dendritische Zellen, wie moDCs und slanDCs, als auch für Endothelzellen (HUVECs). Die Induktion erfolgte dabei über *Toll-like* Rezeptoren (TLR), wie TLR4 (LPS-abhängiger *Toll-like* Rezeptor) und auch über TLR7/8, zwei *Toll-like* Rezeptoren, die für die Bindung von ssRNA, beispielsweise nach Virusinfektion zuständig sind. Unter dem Einfluss dieser Stimuli, kommt es zur Umfaltung des La Proteins, zum Loslösen von seinem potentiellen, indirekt über den *anti-La* mAK 7B6 nachgewiesenen Bindepartner und zum Verlust der nukleären Lokalisation. Im Zytoplasma kann die oxidierte Proteinvariante ihre protektive Aufgabe bezüglich der gebundenen Nukleinsäure nicht weiter ausführen. Es kommt unter normalen Umständen zu Dissoziation der gebundenen Nukleinsäuren und einem potentiellen Abbau dieser. Da bei Autoimmunpatienten jedoch sehr häufig eine Reduktion der Nukleaseaktivität nachweisbar ist, könnte der Nukleinsäureabbau in diesen Patienten gestört sein, was zu einem oxidierten La Protein mit noch gebundener Nukleinsäure führen würde.

Neben der zytoplasmatischen Lokalisation wurde für das La Protein auch eine Lokalisation an der Zelloberfläche diskutiert. Die hier durchgeführten Studien mit den verschiedenen Sauerstoff- oder Stickstoffstressesstimuli zeigten jedoch unter den gewählten Bedingungen keine Exposition des La Proteins auf die Zelloberfläche. Daher wurden apoptotische und nekrotische Zellen als mögliche La Proteinquelle für die Dekoration lebender Nachbarzellen untersucht. War in der Literatur noch über „*apoptotic bodies*“ als Quelle des La Proteins als Autoantigen spekuliert wurden, so konnte hier gezeigt werden, dass das La Protein aus humanen, apoptotischem Zellmaterial zu keiner nachweislichen Oberflächendekoration lebender Zellen führte. Anders verhielt es sich bei nekrotischem Zellmaterial. Hier konnte zum Beispiel humanes oxidiertes La Protein auf den murinen Zellen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Analysen zeigte sich darüber hinaus, dass sowohl oxidiertes als auch reduziertes La Protein auf die Oberfläche verschiedener Zelltypen binden kann. Insgesamt konnte jedoch mehr oxidiertes La Protein auf den verschiedensten Zelltypen nachgewiesen werden, als reduziertes La Protein unter gleichen Bedingungen. Auch ergaben sich Unterschiede bezüglich der Proteinbindung zwischen einzelnen Zelltypen. Vertreter von Antigen präsentierenden Zellen, wie Monozyten oder B-Zellen (Radji), sowie Endothelzellen (HUVECs), aber auch murine A9 Fibroblasten konnten im Vergleich zu T-Zellen und NK-Zellen, mehr La Protein auf ihrer Oberfläche binden. Diese Resultate lassen eine pathophysiologische Bedeutung des La Proteins bei SLE Patienten erkennen. Im Zuge von Zellschädigungen, wie beispielsweise nach UV-Stress, kommt es zu einem nekrotischen Zellzerfall. Dieser führt zur Freisetzung von oxidiertem La Protein, welches auf benachbarte Zellen bindet. Dadurch können sie zum Ziel einer komplementsystemvermittelten Immunreaktion, sowie einer antikörpervermittelten, NK-Zellen gestützten Zellyse (ADCC) werden.

Für die Initiation einer Immunantwort, und im Besonderen für die Reifung autoreaktiver B-Zellen zu autoantikörpernproduzierenden Plasmazellen, bedarf es jedoch zunächst einer Aktivierung von dendritischen Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lösliches La Protein dendritische Zellen aktivieren kann, belegt über die dokumentierte, finale TNF α Sekretion. Dabei war jedoch nicht entscheidend, ob La in einem reduzierten oder oxidierten Zustand vorlag, sondern dass es assoziierte Nukleinsäuren aufwies. Experimentell führten an La Protein gebundene Nukleinsäuren zur Aktivierung von dendritischen Zellen (sIaDCs). Wurde die Nukleinsäuren jedoch zuvor durch RNaseA Behandlung oder die Inkubation in Serum eines gesunden Spenders abgebaut, so lag keine oder eine nur sehr geringe Aktivierung von sIaDCs vor. Eine Inkubation von La Protein in SLE Patientenserum hatte keine solche verminderte Aktivierung dendritischer Zellen zur Folge. Unter Berücksichtigung der oben geschilderten Versuchsergebnisse ließ sich dieses Resultat mit der geringeren Nukleaseaktivität bei SLE Patienten begründen, was bereits aus der Literatur bekannt ist. Diese reduzierte Nukleaseaktivität stellt somit offensichtlich einen entscheidenden Faktor bei der Aktivierung einer Autoimmunantwort in Zusammenhang mit dem La Protein und *anti-La* Autoantikörpern dar.

Mit dieser Arbeit konnte also eindeutig gezeigt werden, dass das La Protein unter sich wechselnden Redoxbedingungen seine Struktur ändert. Dabei spielen die drei enthaltenden Cysteine eine bedeutende Rolle. Derartige Strukturveränderungen beeinflussen die Nukleinsäureschutzfunktion und die Erkennung durch Antikörper. Darüber hinaus bestätigte sich eine ROS induzierte Anreicherung von La im Zytoplasma. Auch die Fähigkeit des La Proteins, aus nekrotischem Zellmaterial auf die Oberflächen von lebenden Zellen zu binden, wurde gezeigt. Dadurch wäre es für Autoantikörper bei SLE Patienten zugänglich und somit pathophysiologisch relevant. Außerdem konnte auch die Eigenschaft von nukleinsäuregekoppelten La Proteins zur Aktivierung dendritischer Zellen belegt werden, was zur krankheitsauslösenden Aktivierung von autoreaktiven T- und im weiteren Verlauf von B-Zellen führen kann. Dadurch konnten die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate deutliche Hinweise auf die pathophysiologische Bedeutung des La Proteins, nicht nur während der Autoimmunerkrankung, sondern auch für die Frühphase der Krankheitsentstehung, geben.

III. Abkürzungsverzeichnis

Alle Nukleotide und Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode angegeben, Ausnahmen wurden im folgenden Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Für Maßeinheiten wurden die Dezimalvorsätze Piko (p, 10^{-12}), Nano (n, 10^{-9}), Mikro (μ , 10^{-6}), Milli (m, 10^{-3}), Zenti (c, 10^{-2}) und Kilo (k, 10^3) verwendet.

A9	murine Fibroblasten
A; Ala	Alanin(e)
ADCC	(<i>antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>) Antikörper abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
Alexa647	Alexa Fluorochrom mit Emissionsmaximum bei 647 nm Wellenlänge
ANA	antinukleäre(r) Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	(<i>professional antigen presenting cell(s)</i>) professionelle, Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BCR	(<i>B cell receptor</i>) B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
BSO	L-Buthionine-(S,R)-suloximine
°C	Grad Celsius
C; Cys	Cystein(e)
CD	(<i>circular dichroism</i>) Zirkulardichroismus
CDR	(<i>complementarity determining region</i>)
cpm	(<i>counts per minute</i>) Ereignisse je Minute
C-terminal	carboxyterminal
CTLA-4	(<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>) negativ regulierender Rezeptor der CD28-Familie
Cu(II)SO ₄	Kupfer(II)sulfat
D	Durchflussfraktion bei Proteinreinigung
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid
DC(s)	(<i>dendritic cell(s)</i>) dendritische Zelle(n)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E _n (n=1-2)	Elutionsfraktionen bei Proteinreinigung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	(<i>enhanced green fluorescent protein</i>) verbessertes grünfluoreszierendes Protein
ELISA	(<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>) antikörperbasiertes Nachweisverfahren
Fab	(<i>fragment antigen binding</i>) Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	(<i>fluorescence-activated cell sorter</i>) Durchflusszytometer
Fc	(<i>fragment crystallizable</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
Fe(II)Cl ₂	Eisen(II)Chlorid
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	" <i>forward scatter</i> " Vorwärtstreuung
g	Gramm
GS	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GTP	Guanintriophosphat
h	Stunde
hAK	humane(r) Antikörper
HEK293T	(<i>human embryonic kidney cells</i>) humane embryonale Nierenzellen
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure)
His6	Hexahistidinsequenz
His6-Tag	Hexahistidinsequenz zur Markierung von Proteinen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Humanserum
hTLR4	humaner <i>Toll-like</i> -Rezeptor 4
HUVEC(s)	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	(<i>internal ribosome entry site</i>) interne ribosomale Eintrittsstelle
K _D	Dissoziationskonstante
l	Liter
L	Lysatfraktion von <i>E. coli</i> bei Proteinreinigung
La	La Protein (Sjögrens-Syndrom Antigen B)
LaC	C-terminale Domäne des La-Proteins
LAL	Limulus-Amöbocyten-Lysat Test
LaN	N-terminale Domäne des La-Proteins
LARPs	(<i>La related proteins</i>) La verwandete Proteine
LPS	Lipopolysaccharid/e
m	Meter
M	Mol [mol/l]
mAk	monoklonale(r) Antikörper
MeOH	Methanol
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität

Abkürzungsverzeichnis

MG	Molekulargewicht
MHC	(<i>major histocompatibility complex</i>) Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
moDC(s)	Monozyten abstammende dendritische Zellen
mRNS	(<i>messenger ribonucleic acid</i>) Boten-Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	„ <i>National Center for Biotechnology Information</i> “, US-amerikanisches Institut für Datenverarbeitung und -speicherung in der Biotechnologie
NES	(<i>nuclear export signal</i>) nukleäres Exportsignal
NFκB	(<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>) spezifische Transkriptionsfaktor
Ni-NTA	(<i>Nickel nitrilotriacetic acid</i>) Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	(<i>nuclear localization signal</i>) nukleäres Lokalisationssignal
NMR-Spektroskopie	(<i>nuclear magnetic resonance</i>) Spektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
NO-Glutathion	Stickstoffmonoxid-Glutathion
NRE	(<i>nuclear retention element</i>) nukleäres Retentionselement
NoLS	(<i>nucleolar localization signal</i>) nukleoläres Lokalisationssignal
nRNP(s)	nukleäres Ribonukleoprotein
N-terminal	aminoterminal
O	Oligonukleotid
OD _λ	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge λ
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	(<i>pathogen-associated molecular pattern</i>) Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PBMC(s)	(<i>peripheral blood mononuclear cell</i>) mononukleäre Zelle(n) des peripheren Blutes
PBS	(<i>phosphate-buffered saline</i>) Phosphat-gepufferte Saline
PCR	(<i>polymerase chain reaction</i>) Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	(<i>pattern recognition receptor</i>) Mustererkennungsrezeptor
PSS	Progressive Systemsklerose
RA	Rheumatische Arthritis
RAGE	(<i>receptor for advanced glycation end products</i>) ein Alarminrezeptor
rhLa	rekombinantes humanes La-Protein
rMFI	relative mittlere Fluoreszenzintensität
RNP	Ribonukleoprotein
RNS	(<i>ribonucleic acid</i>) Ribonukleinsäure
Ro	Ro Protein (Sjögren-Syndrom Antigen A)
RONS	(<i>reactive oxygen and nitric species</i>) reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	(<i>reactive oxygen species</i>) reaktive Sauerstoffspezies
rpm	(<i>rounds per minute</i>) Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RRM	(<i>RNA recognition motif</i>) RNS-Erkennungsmotiv

Abkürzungsverzeichnis

rRNS	(<i>ribosomal ribonucleic acid</i>) ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
scBsTaFv	(<i>single-chain bispecific tandem fragments variable</i>) bispezifische Einzelkettenantikörperderivate
SDS	(<i>sodium dodecyl sulfate</i>) Natriumdodecylsulfat
slanDC(s)	6-sulfo-LacNAc ⁺ dendritische Zelle(n)
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
Sm	Sm Protein
snRNA	(<i>small nuclear ribonucleic acid</i>) kleine nukleäre Ribonukleinsäure
SS-A	Sjögren's Syndrom-Antigen A (Ro 60)
SS-B	Sjögren's Syndrom-Antigen B (La)
SSC	(<i>side scatter</i>) Seitwärtsstreulicht
ssDNS	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNS	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TAA	(<i>tumor associated antigens</i>) Tumor-assoziiertes Antigen
TBS-T	(<i>Tris-buffered saline-Tween</i> ®20) Tris-gepufferte Saline mit Tween®20
TCR	(<i>T cell receptor</i>) T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen 1,2-diamin
TFB	(<i>transformation buffer</i>) Transformationspuffer
TLR	(<i>Toll-like receptor</i>) Toll-ähnlicher Rezeptor
Tm	Schmelztemperatur
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNAs	(<i>transport ribonucleic acid</i>) Transport-Ribonukleinsäure
U	Unit
UV	ultraviolettes Licht / ultraviolette Strahlung
unv.	unverdünnt
V	Volt
V(h/l)	„ <i>variable</i> “-Genabschnitt der (schweren, „ <i>heavy</i> “ oder leichten, „ <i>light</i> “) Immunglobulingene
v/v	„ <i>volume</i> “/„ <i>volume</i> “ Volumenprozent
V _H	variable Domäne einer schweren („ <i>heavy</i> “) Antikörperkette
V _L	variable Domäne einer leichten („ <i>light</i> “) Antikörperkette
W _n (n=1-3)	Waschfraktionen bei Proteinreinigung
w/v	„ <i>weight</i> “/„ <i>volume</i> “ Gewichtsprozent
WAM	<i>WalkerA</i> -Motive
WB	<i>Western blot</i>
wt	Wildtyp
1 x	einfach
10 x	zehnfach
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YTS	NK-Zelllinie

IV. Inhaltsverzeichnis

I. Danksagung	I
II. Zusammenfassung	II
III. Abkürzungsverzeichnis	V
IV. Inhaltsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Primäres Sjögren's Syndrom	2
1.2 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)	3
1.3 Autonukleäre Antikörper (ANAs)	5
1.4 Das La Protein (Autoantigen SS-B)	6
1.4.1 Die genomische Strukturierung des humanen La Proteins	7
1.4.2 Proteinstruktur	8
1.4.2.1 Die räumliche Struktur des La-Motivs, sowie von RRM1 und RRM2	9
1.4.2.2 Sequenzelemente von LaC	10
1.4.2.3 Intrazelluläre Funktionen des La Proteins	12
1.4.4 Zelluläre Lokalisation des La Proteins	14
1.5 Monoklonale <i>anti</i> -La Antikörper	15
1.5.1 <i>Anti</i> -La mAK SW5	16
1.5.2 <i>Anti</i> -La mAK 5B9	17
1.5.3 <i>Anti</i> -La mAK 7B6	18
1.5.4 <i>Anti</i> -La mAK 312B, 2F9, 27E und 32A	19
1.5.5 <i>Anti</i> -La mAK 22A, 24BG7 und 16C	19
1.6 Ausgangssituation zur Untersuchung der La Protein Redoxsensitivität	21
1.7 Zielstellung	22
2. Material	25
2.1 Verbrauchsmaterialien	25
2.2 Geräte und <i>Software</i>	26
2.3 Chemikalien und Reagenzien	28
2.4 Enzyme und Enzympuffer	32
2.5 <i>Kit</i> -Systeme	32
2.6 Molekulargewichtsmarker	33
2.7 Vektoren	33
2.8 Oligonukleotide	34
2.9 Antikörper	35
2.10 Zelllinien	36
2.11 Primäre Zellen	37
2.11.1 Primäre periphere mononukleäre Blutzellen und dendritische Zellen (DCs)	37
2.11.2 Primäre Endothelzellen (HUVEC)	37
2.12 Bakterienstämme	38

Inhaltsverzeichnis

2.13	Grundmedien, Medienzusätze und Zusammensetzung verschiedener Kultivierungsmedien	38
3.	Methoden	41
3.1	Molekularbiologische Methoden	41
3.1.1	Gezielte Generierung von DNS-Fragmenten	41
3.1.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.1.1.2	Oligoannealing – Verbinden von Oligonukleotiden	42
3.1.2	Restriktionsverdau von DNS	42
3.1.2.1	Präparativer Restriktionsverdau von DNS für die Klonierung neuer DNS-Konstrukte	42
3.1.2.2	Analytischer Restriktionsverdau von DNS	43
3.1.3	Elektrophoretische Trennung von DNS-Fragmenten unterschiedlichen Molekulargewichtes	43
3.1.4	Isolation von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel	44
3.1.5	Ligation von DNS-Fragmenten	45
3.1.5.1	Ligation von PCR-Produkten in den pGEM [®] T Easy-Vector	45
3.1.5.2	Gerichtete Ligation von isolierten DNS-Fragmenten in Plasmide	45
3.1.6	DNS-Präparation aus Bakterien	45
3.1.6.1	DNS-Präparation aus Einzelklonkulturen zur anschließenden Überprüfung eines Klonierungserfolgs (Mini-Präparation)	45
3.1.6.2	DNS-Präparation aus einer 100 ml Bakterienkultur zur Gewinnung eines gewünschten DNS-Plasmids (Midi-Präparation)	46
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNS-Plasmiden	47
3.1.8	Überprüfung einer DNS-Präparation auf Reinheit und DNS-Qualität	47
3.1.9	DNS-Sequenzierung	48
3.2	Arbeiten mit Bakterien	48
3.2.1	Generierung kompetenter Zellen	48
3.2.2	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) Zellen	48
3.2.3	Anlegen von Kryo-Kulturen	49
3.3	Proteinbiochemische Methoden	49
3.3.1	Proteinsynthese mit Hilfe von <i>Escherichia coli</i>	49
3.3.1.1	Testkulturen zur Ermittlung eines Bakterienklons mit möglichst hoher Expressionseffizienz	49
3.3.1.2	Kultivierung von Bakterien zu Gewinnung großer Proteinmengen	50
3.3.2	Proteinreinigung nach prokaryotischer Expression	50
3.3.2.1	Zellaufschluss	50
3.3.2.2	Proteinreinigungen mittels Nickelaffinitätschromatographie	51
3.3.2.3	Dialyse	52
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) [127]	53
3.3.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle nach Proteinreinigung	54
3.3.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	54
3.3.6	Immundetektion (<i>Westernblot</i>) nach Proteinreinigung	55
3.3.6.1	Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran	55
3.3.6.2	Immundetektion von Proteinen	55

Inhaltsverzeichnis

3.3.7	Analytische Studien mit Immundetektion von Proteinen	56
3.3.7.1	Oligomerisationsstudien von La wt und dessen Cysteinmutanten	56
3.3.7.2	Dimerisationsstudien von La wt und dessen Cysteinmutanten	57
3.3.7.3	Analyse von RNS-Bindung durch La wt und dessen Cysteinmutanten	57
3.3.7.4	Analyse von DNS-RNS-Hybridbindung an La wt und dessen Cysteinmutanten	58
3.3.8	ELISA	58
3.3.8.1	Test der redoxabhängigen Antigenität der rekombinanten La Proteine gegenüber den verschiedenen monoklonalen <i>anti</i> -La Antikörpern (<i>anti</i> -La mAK)	58
3.3.8.2	Bindungskurven der monoklonalen <i>anti</i> -La Antikörper gegenüber La wt und La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	59
3.3.8.3	Analyse des TNF α -Gehalts in Zellkulturüberständen von dendritischen Zellen (sIaDCs) mit Hilfe eines TNF α -ELISAs	60
3.4	Biophysikalische Methoden	61
3.4.1	UV-Spektrenaufnahme von Proteinen	61
3.4.2	CD-Spektrenaufnahme, Sekundärstrukturanalyse und Bestimmung der Schmelztemperatur von Proteinen	62
3.5	Zellbiologische Methoden	62
3.5.1	Kultivierung von adhärenter Zellen bzw. Suspensionszellen	62
3.5.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	63
3.5.3	Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen, T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen	64
3.5.3.1	Isolation von PBMCs	64
3.5.3.2	Isolation und Kultivierung von T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen	64
3.5.4	Zellfärbung mit Lebendfarbstoff eFluor670 [®]	65
3.5.5	Generierung stabiler Zelllinien inklusive Subzellklonierung	65
3.5.5.1	Generierung von stabilen Zelllinien	65
3.5.5.2	Subklonierung von Zellen	66
3.5.6	Fluoreszenzmikroskopische Analysen zur Bestimmung der intrazellulären La Proteinlokalisierung	66
3.5.6.1	Präparationen von Zellen für die Epifluoreszenzanalyse	66
3.5.6.2	Quantifizierungen von Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen	68
3.5.7	Durchflusszytometrie mit BD FACS Calibur	69
3.5.7.1	La-Bindungskurven auf verschiedenen Zelllinien	69
3.5.8	La-Bindung auf Empfängerzellen nach Kokultivierung mit lebenden, apoptotischen und nekrotischen La-Donorzellen	70
3.5.9	Aktivierung von dendritischen Zellen durch La Proteine	71
4.	Ergebnisse	73
4.1	Generierung und Produktion rekombinanter La Proteine	73
4.1.1	Generierung von vier rekombinanten La Proteinen: La wt und dreier Cysteinmutanten	73
4.1.2	Produktion und Reinigung der La Cysteinmutanten	76
4.1.2.1	Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmungen	76
4.1.2.2	Westernblot-Analysen	78

Inhaltsverzeichnis

4.2	<i>In vitro</i> Untersuchung zum Einfluss der Redoxsensitivität auf die Antigenerkennung	80
4.2.1	ELISA-Studien zur redoxsensitiven Antigenerkennung durch <i>anti</i> -La mAK	80
4.2.1.1	ELISA-Studie zur redoxsensitiven Antigenerkennung von La wt und dessen Cysteinmutanten	80
4.2.1.2	ELISA-Studie zur redoxsensitiven Antigenerkennung von LaN und LaN_C ₁₈ A durch <i>anti</i> -La mAK 312B und 2F9	82
4.2.1.3	ELISA-Studie zur K _D -Wertbestimmung von SW5, 5B9, 7B6 und 312B gegenüber La wt und La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	84
4.2.2	ELISA-Studie zur Analyse der selektiven, redoxabhängigen La Proteinerkennung durch Autoantikörper aus SLE-Patientenseren	86
4.2.3	<i>Westernblot</i> -Analysen zur redoxsensitiven Antigenerkennung durch <i>anti</i> -La mAK	87
4.2.3.1	Oligomerisationsverhalten von La wt und dessen Cysteinmutanten und redoxabhängige Antigenerkennung durch <i>anti</i> -La mAK	87
4.2.3.2	Dimerisationsstudie	92
4.2.4	La Proteinerkennung von SW5, 5B9, 7B6 und 312B in intrazellulären Färbungen	94
4.2.4.1	Generierung Fusionsproteine EGFP-La wt und EGFP-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	95
4.2.4.2	Antigenerkennung durch SW5, 5B9, 7B6 und 312B in 3T3 EGFP-La wt und 3T3 EGFP-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A Zellen	97
4.2.4.3	Redoxabhängige Antigenerkennung durch SW5, 7B6 und 312B in 3T3-La wt Zellen	99
4.3	Analysen zur Bestimmung biophysikalischer Grundlagen der La Redoxsensitivität	104
4.3.1	Aufzeichnung der CD-Spektren von La wt und dessen Cysteinmutanten, sowie die Ermittlung der Helikalität	104
4.3.2	Bestimmung der Schmelztemperatur von La wt und der Tripelcysteinmutante	107
4.4	Physiologische Auswirkungen der La Redoxsensitivität	109
4.4.1	Sauerstoffstressbedingte Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung	109
4.4.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Quantifizierung der zytoplasmatischen La Anreicherung in 3T3 EGFP-La wt Zellen	110
4.4.1.2	Rezeptorabhängige Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung in verschiedenen humanen Zellen	112
4.4.1.3	TLR4 abhängige zytoplasmatische La Anreicherung	113
4.4.1.4	TLR7/8 abhängige zytoplasmatische La Anreicherung	116
4.4.1.5	Rezeptorabhängige Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung in Endothelzellen	117
4.4.2	Das La Protein und seine Translokation auf die Zelloberfläche	119
4.4.2.1	Bindung von rekombinanten La Protein auf murinen A9 Zellen	119
4.4.2.2	Bindung von rekombinantem La Protein auf verschiedenen humanen Zellen	120
4.4.2.3	Durchflusszytometrische Studie zur La Proteinbindung auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit lebenden, apoptotischen oder nekrotischen humanen HeLa Zellen	122
4.4.3	Untersuchung zum Einfluss der Cysteine auf die Nukleinsäurebindung	126
4.4.3.1	UV-Spektrenanalyse	127
4.4.3.2	Die Bindung von ssRNS, dsRNS und DNS-RNS-Hybriden durch die rekombinanten La Proteine	130
4.4.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen zum Einfluss freien La Proteins auf das Immunsystem	132
4.4.4.1	Kultivierung von slanDCs in Anwesenheit von La wt und La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	132

4.4.4.2 Kultivierung von slanDCs in Anwesenheit von La wt nach Inkubation in SLE Seren beziehungsweise Seren gesunder Spender	134
 5. Diskussion	 139
5.1 Redoxabhängige Antigenerkennung des La Proteins durch <i>anti</i> -La mAK 312B und 7B6	139
5.1.1 Redoxabhängige Antigenerkennung durch den <i>anti</i> -La mAK 312B	139
5.1.2 Redoxabhängige Antigenerkennung durch den <i>anti</i> -La mAK 7B6	142
5.1.3 Redoxabhängige La Proteinerkennung durch Autoantikörper aus SLE Patientenseren	144
5.2 Einfluss der La Cysteine auf molekularen Level	145
5.3 Einfluss von oxidativen Stress auf die zelluläre Lokalisation des La Proteins	147
5.3.1 Sauerstoffstressbedingte Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung	147
5.3.2 Einführung eines potentiellen LPS-Sensorsystems	150
5.3.3 Das La Protein und seine Translokation auf die Zelloberfläche	152
5.4 Das La Protein und die Aktivierung von DCs	153
5.5 Verfeinertes Modell zur Induktion von einer Immunantwort durch La Protein und Autoantikörper	153
 6. Literatur	 159
 7. Anhang	 X
7.1 Homologe Proteine zum humanen La Protein	X
7.2 Vektorkarten der fünf Basisvektoren pGEM [®] -T Easy, pSecTag2B [®] , pET28a, p6NST70-MCS, pEGFP-c1	XIII
 V. Abbildungsverzeichnis	 XIV
VI. Tabellenverzeichnis	XVIII
VII. Erklärung	XX

1. Einleitung

Das humane Immunsystem ist ein hoch komplexes, streng reguliertes und gleichzeitig sehr flexibles System. Es besitzt die Aufgabe den menschlichen Organismus vor Pathogenen wie Parasiten, Bakterien, Viren und vor der Ausbreitung entarteter, maligner Zellen zu schützen. Dafür muss es in der Lage sein, „Gefährlich“ von „Ungefährlich“ zu unterscheiden, dass heißt, das Immunsystem muss körpereigene, gesunde Strukturen erkennen und eine Toleranz ihnen gegenüber ausbilden (Selbsttoleranz). Die Selbsttoleranz wird gewährleistet durch die strenge Selektion von wichtigen Akteuren des Immunsystems. Dazu zählen die im Thymus heranreifenden T-Zellen und die im Knochenmark sich entwickelnden B-Zellen. Zellen mit einem B-Zellrezeptor, der an körpereigene Antigene bindet und T-Zellen, die körpereigene Peptide auf MHC-Komplexen erkennen, werden durch negative Selektion in die Apoptose getrieben. Jedoch kommt es trotz der strengen Auslese immer wieder vor, dass B-Zellen und T-Zellen mit einer geringen Affinität zu körpereigenen Strukturen überleben. Gelangen solche Zellen dann in Körperregionen mit verletztem und entzündetem Gewebe, wo sie auf große Mengen ihres Antigens treffen können, kann es zur Aktivierung dieser Zellen kommen. Somit wäre eine mögliche Ausgangssituation für die Entwicklung einer Autoimmunreaktion beziehungsweise eine Autoimmunkrankheit gegeben [1]. Insgesamt lassen sich Autoimmunkrankheiten äquivalent zu den Überempfindlichkeitsreaktionen in vier verschiedenen Typen klassifizieren, siehe Tabelle 1.

Zu den Typ-III-Immunkomplexkrankheiten gehören unter anderem das Primäre Sjögren's Syndrom und der Systemische Lupus Erythematodes (SLE), beide Syndrome zählen zu den Kollagenosen. Bei dieser Art von Autoimmunerkrankung kommt es zu Entzündungen, die meist das Bindegewebe und Blutgefäße betreffen, aber auch alle inneren Organe befallen können. Die Diagnose solcher Kollagenosen, sowie deren Spezifizierung sind sehr schwierig, weil eine große Anzahl verschiedener, zum Teil überlappender Symptome auftreten können. Zu diesen zählen Schmerzen in den Gelenken (Arthritis) und der Muskulatur, Trockenheit der Schleimhäute oder Hautrötungen, die zum Teil mit Ausschlägen und Flechtenbildung verbunden sind. Zusätzlich treten Beschwerden wie Müdigkeit, Stress und Schlafstörungen auf. Im späteren Krankheitsverlauf treten auch Fibrosen auf, dabei handelt es sich um Bindegewebsveränderungen auf Grund von Entzündungen [2].

Tabelle 1: Klassifizierung von Autoimmunkrankheiten (angelehnt an Janeway 2002, [1]).

Typus	Bezeichnung	Beispiel		
		Syndrom	Antigen	Folgen
Typ I	<i>IgE-vermittelte Reaktionen</i>	<i>Ausnahme: derzeit gelten IgE Immunglobuline nicht als Ursache für Autoimmunkrankheiten.</i>		
Typ II	Antikörper gegen Zelloberflächen- oder Matrixantigene	autoimmune hämolytische Purpura	Rhesus-Blutgruppenantigene	Zerstörung der roten Blutkörperchen durch das Komplement und FcR ⁺ -Phagozyten, Anämie
		Goodpasture-Syndrome	nichtkollagenöse Domäne des Basalmembrankollagens	Glomerulonephritis, Blutungen in der Lunge
		Pemphigus vulgaris	epidermales Cadherin	Blasenbildung der Haut
		akutes rheumatisches Fieber	Zellwandantigene von Streptokokken, Kreuzreaktion der Antikörper mit Herzmuskelzellen	Arthritis, Myocarditis, in der Spätphase Vernarben der Herzklappen
Typ III	Immunkomplex-erkrankungen	gemischte essentielle Kryoglobulinämie	Rheumafaktor-IgG-Komplexe (mit oder ohne Hepatitis C-Antigen)	Systemische Vasculitis
		Systemischer Lupus Erythematoses	DNA, Histone, Ribosome, snRNP, scRNP	Glomerulonephritis, Vasculitis, Hautausschlag
		Rheumatoide Arthritis	Rheumafaktor-IgG-Komplexe	Arthritis
Typ IV	T-Zell-vermittelte Erkrankungen	Insulinabhängiger Diabetes mellitus (Typ I)	Antigen auf den β -Zellen des Pankreas	Zerstörung der β -Zellen
		Rheumatoide Arthritis	Unbekanntes Antigen in der Synovialmembran der Gelenkkapseln	Gelenkentzündungen und- schädigungen
		Multiples Sklerose	Basisches Myelinprotein Proteolipoprotein, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	Einwanderung von CD4-T-Zellen in das Gehirn, Schwäche

1.1 Primäres Sjögren's Syndrom

Das Primäre Sjögren's Syndrom ist eine systemische Autoimmunkrankheit, bei der es zu einer Fehlfunktion der sezernierenden Drüsen kommt. Diese bedingt wiederum eine Trockenheit wichtiger Schleimhäute in Nase, Mund, Augen, Pharynx, Larynx und Vagina. Bei den Betroffenen handelt es sich meist um Frauen mittleren Alters. Die tatsächlichen Ursachen des Primären Sjögren's Syndroms sind noch unklar, jedoch geht man davon aus, dass sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren eine Rolle beim Auftreten der Krankheit spielen. Zwei Schlüsselsymptome des Primären Sjögren's Syndroms sind besonders charakteristisch: zum einen das subjektive Trockenheitsgefühl im Mund (Xerostomie) und zum anderen ein Trockenheitsgefühl der Augen (Xerophthalmie). Die Xerostomie wird durch ein vermindertes Speichelvolumen verursacht, welches die

Nahrungsaufnahme und das Sprechen negativ beeinflusst. Außerdem kann die Mundtrockenheit vermehrt zu lokalen Infektionen, Karies und paradontalen Erkrankungen führen. Xerophthalmie wird durch eine verminderte Tränensekretion hervorgerufen. Folgen dieser sind oft Juckreiz und Müdigkeit der Augen, starke Lichtempfindlichkeit, verminderte Sehschärfe, sowie Reizung und Zerstörung des Bindehautepithels und erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Augeninfektionen [3].

Das Primäre Sjögren's Syndrom zeichnet sich außerdem durch das Auftreten von Autoantikörpern aus, welche gegen nukleäre Strukturen gerichtet sind, sogenannte ANAs. So wurden zum Beispiel 1974 von Mattioli und Reichlin [4] erstmals Autoantikörper bei einem Patienten mit Sjögren's Syndrom gegen ein 48 Kilodalton großes nukleäres Protein entdeckt. Das Autoantigen war bis dato unbekannt und wurde so als Sjögren's Syndrom Autoantigen B, kurz SS-B oder auch La bezeichnet. Kurz zuvor wurde das Sjögren's Syndrom Autoantigen A (SS-A), auch Ro60 genannt, entdeckt [5]. Die Kürzel La und Ro gehen dabei auf die ersten beiden Buchstaben der Namen der Patienten zurück, aus denen die entdeckten Autoantikörper stammten.

1.2 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Der Systemische Lupus Erythematoses, kurz SLE, ist eine systemische Autoimmunkrankheit, welche schubweise verläuft. SLE wird auch als generalisierte entzündliche-rheumatische Erkrankung mit Autoimmunpathogenese und variablen Befall zahlreicher Organe beschrieben. Das mittlere Ersterkrankungsalter liegt bei etwa 30 Jahren. Mehr als 80 % der Betroffenen sind Frauen, daher wird angenommen, dass Östrogen als Trigger die Krankheit beeinflussen kann. Eine Erstmanifestation der Krankheit tritt häufig nach UV-Exposition auf. Neben dieser und hormonellen Einflüssen (Östrogene) können auch eine genetische Prädisposition, Stress, Medikamente oder Virusinfektionen zu Krankheitsschüben führen.

Bei der Untersuchung der Frage, wie es bei SLE Patienten zur Durchbrechung der Selbsttoleranz und somit zu Reaktionen gegen körpereigene Antigene kommen kann, wurde eine Reihe von verschiedenen Genen identifiziert. Sie lassen sich entsprechend der physiologischen Funktion der durch sie codierten Proteine in drei unterschiedliche Gruppen gliedern. Die Gene der Proteine, welche an der Beseitigung toter und sterbender Zellen beteiligt sind, werden der Gruppe eins zugeordnet. Zu ihr zählen zum Beispiel die Gene zur Codierung des Komplementproteins C1q, der Serumkomponente Amyloid P, sowie das Gen für die DNase I. Die Gene der Proteine, welche an der Regulation der Toleranzschwellen für die Aktivierung von B- und T-Zellen beteiligt sind, sind einer zweiten Gruppe zugehörig. Dazu zählen unter anderem die Gene von Fas, des Fas-Ligandens, des B-zellinhibitorischen Rezeptors CD22 und des Zellzyklusinhibitors p21. Zur dritten Gruppe gehören Gene, deren

Proteine organspezifische Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Zu ihnen werden die Gene der polymorphen Fcγ-Rezeptoren, FcγRIIa und FcγRIII zugeordnet. Mutationen in diesen Genen sind vor allem bei der Entstehung von Nephritis in Erscheinung getreten [1].

Die Allgemeinsymptomatik von SLE zeichnet sich durch Leistungsinsuffizienz, Erschöpfung, Fieber und Gewichtsabnahme aus. Etwa die Hälfte der Betroffenen zeigt als variable Hautmanifestation das klassische Schmetterlingserythem im Gesicht, bis zu 70 % der Patienten leiden unter Haarausfall (Alopezie). Neben Gelenkschmerzen können als weitere Symptome Nierenschäden (Lupusnephritis oder Glomerulonephritis), Herzprobleme (Perikarditis oder Myokarditis), sowie neurologische Symptome auftreten [6]. Grund dafür ist eine Ansammlung von Immunkomplexen aus Autoantikörpern und Nukleoproteinen aus sterbenden, somatischen Zellen. Diese Komplexe lagern sich zum Beispiel an den Wänden kleiner Blutgefäße, an der Basalmembran der Glomeruli, in Gelenken oder anderen Organen ab. Dort führen sie sowohl zu einer Aktivierung des Komplementsystems als auch der Phagozyten über den Fc-Rezeptor. Als Folge der Phagozytenaktivierung kommt es zu erheblichen Gewebeschädigungen, bedingt durch die massive Freisetzung von Interleukinen und Tumornekrosefaktor (TNF), weiterer Nukleoproteinfreisetzung und damit zur vermehrten Bildung von Immunkomplexen [1]. Die daraus resultierenden teils chronischen Entzündungen der betroffenen Gewebe und Organe führen nicht selten bei fehlender Behandlung zu deren Funktionsverlust und zum Tod des Patienten.

Die Entstehung von solchen immunogenen Autoantikörper-Nukleoprotein-Komplexen wird bei SLE Patienten durch einen weiteren Umstand gefördert. Unter normalen physiologischen Bedingungen gehen Zellen, die zum Beispiel nach starker UV-Exposition, Virusbefall oder nach Einnahme bestimmter Medikamente geschädigt wurden, in die Apoptose. Die daraus resultierenden *apoptotic bodies* verpacken das vormals intrazelluläre Material und werden durch Phagozyten beseitigt. Aufgrund dessen liegt körpereigenes Zellkernmaterial, also potentielle Autoantigene, in der Regel nicht frei zugänglich vor. Im Fall von SLE Patienten liegt jedoch oft ein Defekt der Monozyten und Makrophagen vor, welche für die Beseitigung von apoptotischen Zellmaterial verantwortlich sind [7; 8]. Dies führt zu einer Ansammlung dieses Materials und zur Entstehung von sekundären Nekrosen [9; 10]. Durch Nekrose werden die vormals intrazellulären und nukleären Bestandteile aus den Vesikelstrukturen der *apoptotic bodies* zu löslichen, freizugänglichen Faktoren, die als potentielle Autoantigene fungierenden können.

Erste Hinweise auf Autoantikörper gegen das La Protein bei Patienten mit SLE wurden schon 1975 durch Köhler *et al.* sowie durch Alsphaugh und Tan beschrieben [9; 10].

1.3 Autonukleäre Antikörper (ANAs)

Bei Autoantikörpern handelt sich um Immunglobuline, welche gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) gerichtet sind. Zu den potentiellen Zielstrukturen zählen Proteine, Glykoproteine, Nukleinsäuren, Phosphorlipide und Glykosphingolipide [11]. Eine Untergruppe dieser Immunglobuline bilden die antinuklearen Autoantikörper, kurz ANAs. Diese sind gegen verschiedene Zielstrukturen des Zellkerns gerichtet, wie zum Beispiel: doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (dsDNS), Nukleosomen, die Zentromere von Chromosomen oder den Spindelapparat. Außerdem wurden bereits Antikörper gegen Bestandteile der Zellkernmembran wie Lamin A, B oder C, und den Lamin-B-Rezeptor entdeckt, sowie Antikörper gegen die RNS-Polymerase I und Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs). Zu den *anti*-RNP Immunglobulinen gehören ANAs gegen U1nRNP, Sm, Ro (SS-A) und La (SS-B) [11].

ANAs treten bei gesunden Menschen nicht auf. Jedoch konnten bei Patienten höheren Alters geringe Titer von Autoantikörpern labordiagnostisch bestimmt werden. Diese sind aber bei vielen Kollagenosen, vor allem bei dem Primären Sjögren's Syndrom, SLE, dem Sharp-Syndrom, der Progressiven Systemsklerose, der Polymyositis (PM) / Dermatomyositis (DM) oder der Rheumatischen Arthritis (RA) zu finden. Des Weiteren ist bekannt, dass ANAs auch bei anderen Autoimmunkrankheiten, Tumoren, chronischen Lebererkrankungen, wie der Autoimmunhepatitis (AIH) oder der Primären biliären Zirrhose (PBC), in Erscheinung treten können [12].

Für die Diagnostik werden als Standardtechnik humane Epithelzellen der Larynxkarzinomzelllinie HEp-2 für einen indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) verwendet. Ist ein positives Fluoreszenzsignal bei einer geringeren Verdünnung als (1:80) zu erkennen, wird ein positiver Befund mit einem Titer ($> 1:80$) angegeben. Außerdem können anhand des Färbemusters das jeweilige Autoantigen und somit der vorliegende Kollagenosetyp bestimmt werden. Die folgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die möglichen nukleären Fluoreszenzfärbemuster auf HEp-2 Zellen bei einem ANA-Screening.

Neben ANAs können bei dem IIFT mit HEp-2 Zellen auch homogene, granuläre oder filamentöse Fluoreszenzmuster des Zytoplasmas beobachtet werden. Diese Muster sind auf Autoantikörper zurückzuführen, die nicht in die Gruppe der ANAs gehören, aber ebenso mit Kollagenosen assoziiert sind. Sie können gegen Ribosomen, Lysosomen, den Golgi-Apparat, Mitochondrien beziehungsweise Aktin gerichtet sein [12].

Tabelle 2: Nukleäre Fluoreszenzfärbemuster von Hep-2 Zellen mit deren korrelierenden Autoantigenen und den assoziierten Autoimmunkrankheiten (adaptiert nach [12]).

nukleäres Fluoreszenzmuster	Autoantigen	Krankheitsassoziation
homogen	dsDNS	SLE
	Nukleosomen	SLE
	Histone	SLE, RA
granulär	Ro (SS-A), La (SS-B)	Primäres Sjögren's Syndrom, SLE, PBC
	RNP, Sm	SLE
	PCNA	SLE
	Mitosin	Neoplastische Erkrankungen (Lungen-, Mammakarzinom)
	Scl-70	diffuse Form des PSS
nukleolär	Scl-70	diffuse Form des PSS
	PM-Scl	Überlappungssyndrom von PM / DM u. PSS
	Fibrillarin	diffuse Form des PSS
	RNA-Polymerase I	PSS
	NOR-90	PSS
gepunktet	Nuclear dots	PBC
	Zentromer	CRET-Syndrom
Kernmembran	Lamin-B-Rezeptor	PBC
	Lamin A, B, C	PBC
	gp210	PBC

1.4 Das La Protein (Autoantigen SS-B)

Das humane La Protein (La) wurde, wie bereits oben erwähnt, schon in den frühen 1970er Jahren als Autoantigen (SS-B) in Patienten mit Primärem Sjögren's Syndrom oder SLE entdeckt [4, 9, 10]. Anfänglich wurde es daher mit Hilfe von Patientenseren analysiert und charakterisiert. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass La in der Lage ist Ribonukleoproteinkomplexe zu bilden, da bei seiner Reinigung kleine RNS-Moleküle kopräzipitiert werden konnten [4; 13; 14]. Das La Protein kommt abundant in allen Geweben des Menschen vor, mit etwa 2×10^7 Molekülen pro Zelle [15]. Dabei handelt es sich jedoch nicht um ein ausschließlich humanes Protein. So lassen sich zum Beispiel aktuell in der NCBI-Datenbank mit Hilfe der „protein blast“-Funktion La Proteine in mindestens 63 verschiedenen Wirbeltierarten finden [NCBI-Datenbank: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Analysedatum: 04.05.2014]. Die Homologie der Aminosäuresequenz liegt für die erhaltenen Resultate zwischen 75 % beim Haushuhn (*Gallus gallus*) und 99 % beim Gemeinen Schimpansen (*Pan troglodytes*), siehe Anhang 7.1. Auch in der Literatur lassen sich Hinweise auf Homologe des La Proteins in vielen Eukaryonten finden [16–19], sowie in *Saccharomyces cerevisiae* [20; 21] oder *Drosophila melanogaster* [20; 22]. Das La Protein kann daher als ubiquitär auftretendes Protein bezeichnet werden. Auch zeigt sich, dass die Homologien hauptsächlich die N-terminale Domäne des Proteins betreffen. Die C-terminale Domäne ist weniger konserviert und bisweilen stark verkürzt, zum Beispiel in *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* und *Trypanosoma brucei* [23]. Die Phänomene des ubiquitären Auftretens des La Proteins und die Aminosäuresequenzkonservierung sind erste Indizien für die essentielle Wichtigkeit des Proteins.

Einen Beleg dafür fanden Park *et al.* 2006 mit Hilfe von *Knock-out*-Mäusen. Dabei wurde gezeigt, dass das La Protein in der frühen Embryogenese essentiell für Säuretiere ist [24]. La spielt außerdem eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* [22]. Um diese Fakten genauer nachvollziehen zu können, ist es notwendig die Struktur und die Funktion des La Proteins besser zu verstehen.

1.4.1 Die genomische Strukturierung des humanen La Proteins

Nach Chambers *et al.* 1983 und Pruijn *et al.* 1994 liegt das Strukturgen für das humane La Protein auf dem Chromosom 2 und besteht aus 13 Exons [25; 19]. Allerdings erstreckt sich der codierende Leserahmen nur von Exon 2 mit dem eigentlichen Start-AUG bis Exon 11. Neben dem Exon 1 wurde 1994 durch Tröster *et al.* das erste von zwei alternativen Exons, das Exon 1' gefunden [26]. Das zweite alternative Exon, das Exon 1'' wurde 1997 durch Bachmann *et al.* beschrieben [27]. Daraus ergeben sich drei verschiedene mRNS-Isoformen für das La Protein, die sich in den 5'-nichtcodierenden Regionen (5'-UTR) unterscheiden, welche durch die drei Exon 1 Varianten repräsentiert werden.

Darüber hinaus finden sich in der Arbeit von Chambers *et al.* Hinweise auf einen Promotor, welcher typisch für Haushaltsgene ist [25]. Der klassische La Promotor zeichnet sich durch die Abwesenheit einer für die Genregulation entscheidenden TATA-Box, sowie dem Vorhandensein GC-reicher Regionen aus. Dies sind Indizien für eine permanente Expression des La Gens [25]. Von Grölz *et al.* wurde ein weiterer, alternativer Promotor mit einer von der TATA-Box-Konsensussequenz leicht abweichenden Nukleotidabfolge (TACAAA) gefunden. Grölz *et al.* gehen davon aus, dass diese Sequenz im Falle der alternativen Exons 1'- und Exon 1''-mRNS das sogenannte *core*-Promotor-Element repräsentieren könnte [28]. Die drei möglichen La-mRNS Sequenzen entstehen durch die jeweilige Nutzung einer der beiden Promotoren in Kombination mit alternativem *splicing*, siehe Abbildung 1 [28].

Auffällig sind auch die Unterschiede im Exon 7. Alle drei Pseudogene weisen Insertionen von Adenin-Nukleotiden auf. Dabei kam es entweder zum Einschub von 4, 16 oder 24 Adeninen. Grölz *et al.* schrieben 1997, dass das Pseudogen mit der längsten Insertion das evolutionär Älteste ist, während das jüngste Pseudogen die kürzeste Insertion aufweist [29]. Die hier zu Grunde liegende genomische Region wird in der Literatur auch als *hot spot region* des La Proteins bezeichnet [27; 30].

Bei den zahlreichen Untersuchungen zur genomischen Strukturierung des La Gens wurden nicht nur die Hinweise auf alternative Exon 1-Sequenzen gefunden, einen alternativen Promotor und Pseudogene, sondern auch Hinweise auf eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Grölz *et al.* und Pautz *et al.* vermuten, dass sie am Start-AUG im Exon 2 liegt, wobei jedoch die genaue Nukleotidsequenz und Lokalisation der IRES unbekannt sind [28].

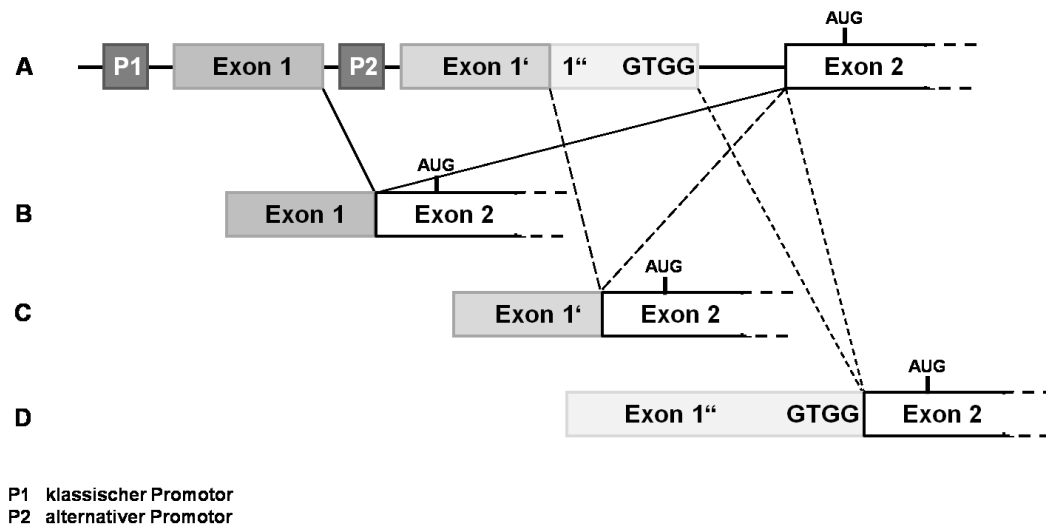


Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen La Gens inklusiver der La-mRNS-Isoformen (adaptiert nach Grölz et al. 1998 [28]). (A) Anfang des La Gens mit klassischem Promotor P1, dem alternativem Promotor P2, sowie dem Exon 1, Exon 1' beziehungsweise Exon E1'' und dem Exon E2 mit dem Start-AUG. (B) klassische La-mRNS mit Exon 1; (C) alternative La-mRNS mit Exon 1'; (D) alternative La-mRNS mit Exon 1''

1.4.2 Proteinstruktur

Die Primärstruktur des 46,8 kDa großen La Proteins zeichnet sich durch 408 Aminosäuren (AS) aus und wird in eine N- und eine C-terminale Domäne untergliedert, welche kurz als LaN und LaC bezeichnet werden, siehe Abbildung 2.

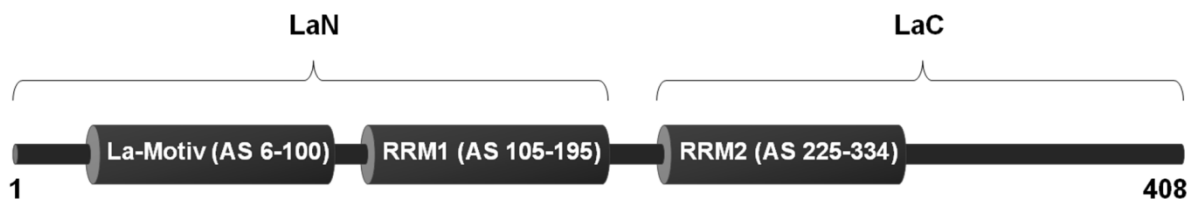


Abbildung 2: Schematische Struktur des La Proteins. Das 408 AS große La Protein besteht aus einer N- und einer C-Terminalen Domäne, die kurz als LaN und LaC bezeichnet werden. LaN beinhaltet zwei funktionelle Domänen, das namensgebende La-Motiv und das RNS-bindende Motiv 1 (RRM1). Ein zweites RRM (RRM2) schließt sich nach einem flexiblen Linker in der C-terminalen Domäne an. LaC besitzt darüber hinaus ein etwa 80 AS langes Element ohne weitere räumlich getrennte Domänen.

LaN besteht aus zwei räumlich getrennten Domänen. Eine davon ist das namensgebende La-Motiv (AS 6 - 100). Dieses Motiv ist bei allen Eukaryonten auch in La-verwandten Proteinen zu finden (La-related Proteins, LARPs). Diese Proteine weichen jedoch stark in ihrer übrigen Aminosäuresequenz, Struktur und Funktion von der des La Proteins ab [31; 32]. Dem La-Motiv folgt eine RNS-bindende Domäne, das *RNA recognition motif* 1 (RRM1).

Die zwei Domänen sind als Ribonukleinsäurebindestellen des La Proteins beschrieben worden [32]. Ein zweites RRM befindet sich in LaC (RRM2). Dem RRM2 folgen etwa 80 AS. Sie bilden den flexiblen C-Terminus des La Proteins, ohne weitere räumlich getrennte Domänen. Dieses Element des Proteins zeichnet sich vor allem durch die hier angesiedelten Phosphorylierungsstellen aus. In der Literatur finden sich Hinweise, dass La *in vivo* phosphoryliert vorliegt [33; 34]. Folgende AS wurden als Phosphorylierungsstellung identifiziert: T₃₀₂, S₃₂₅, T₃₆₂ sowie S₃₆₆ [35]. Die ersten drei genannten weisen meist nur einen geringen Phosphorylierungsgrad auf, dem gegenüber ist S₃₆₆ als Substrat der Casein-Proteinkinase (CK2), überwiegend phosphoryliert [36].

1.4.2.1 Die räumliche Struktur des La-Motivs, sowie von RRM1 und RRM2

Bisher konnte keine dreidimensionale Struktur des gesamten La Proteins ermittelt werden. Jedoch gelang es Alfano *et al.* 2004 die Struktur des La-Motivs und des RRM1s mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie zu bestimmen [37]. Dafür wurden die Domänen getrennt voneinander kloniert und als rekombinante Proteine hergestellt. Die Kristallisation mit anschließender NMR-Spektroskopie für das RRM2 gelang bereits ein Jahr zuvor [38]. In Abbildung 3 sind die räumlichen Darstellungen des La-Motivs, sowie von RRM1 und RRM2 zu sehen.

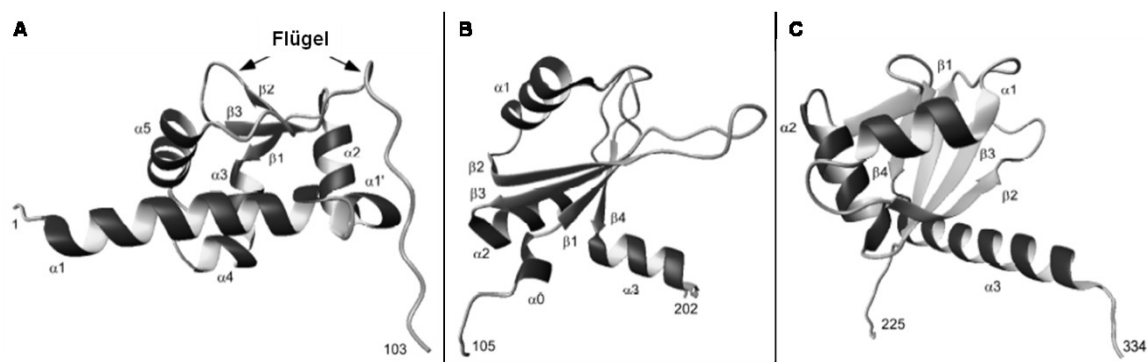


Abbildung 3: Dreidimensionale Strukturen des La-Motivs, sowie von RRM1 und RRM2. Dargestellt sind die räumlichen Strukturen der drei La-Domänen. (A) Das Resultat der NMR-Spektroskopie des La-Motivs im AS-Sequenzabschnitt 1 – 103 zeigt, dass diese Domäne überwiegend aus α -Helices mit folgender Topologie besteht: $\alpha 1-\alpha 1'-\alpha 2-\beta 1-\alpha 3-\alpha 4-\alpha 5-\beta 2-\beta 3$. Auffällig sind die beiden *loop*-Elemente vor und nach dem $\beta 3$ -Strang, sie bilden die flexiblen „Flügel“-Strukturen. (B) Die AS 105 – 202 ergeben das RRM1, dessen 3D-Struktur im mittleren Bild dargestellt ist. Die Topologie der Sekundärstrukturelemente des RRM1 ist die folgende: $\alpha 0-\beta 1-\beta 2-\alpha 1-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\alpha 3$ [37]. (C) Die RRM2-Domäne von LaC umspannt den AS-Sequenzabschnitt 225 – 334 und weist eine atypische RRM-Topologie auf: $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4'-\beta 4-\alpha 3$ [38].

Bei der Untersuchung der NMR-Struktur des La-Motivs fanden Alfano *et al.*, dass diese Domäne in ihrer Tertiärstruktur eine sogenannte *winged helix*-Faltung aufweist. Das ist insofern nicht überraschend, da solche Faltungsmotive für DNS-bindende Proteindomänen

typisch sind, vor allem bei essentiellen Proteinen der Embryogenese, Entwicklung und Alterung [39]. Klassischer Weise bestehen *winged helix*-Faltungen aus drei α -Helices (α) und einem β -Faltblatt aus drei antiparallel verlaufenden β -Strängen (β) mit folgender Topologie: $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ - $\beta 3$. Das β -Faltblatt ist dabei gegenüber den α -Helices angeordnet und bildet zwischen seinem zweiten und dritten β -Strang, sowie dem dritten β -Strang anschließend, flexible *loop*-Elemente, die sogenannten „Flügel“ aus. Beim Vergleich der Topologie der klassischen *winged helix*-Faltung mit der des humanen La Proteins fallen zusätzliche α -Helices ($\alpha 1'$, $\alpha 2$ und $\alpha 4$) auf, siehe (A) Abbildung 2. Sie werden als Insertionen in die Konsensussequenz $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 3$ - $\alpha 5$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ bewertet. Neben der NMR-Struktur der rekombinanten La-Motiv-Domäne von Alfano *et al.* wurde 2004 durch Dong *et al.* auch das La-Motiv von *Trypanosoma brucei* kristallografisch untersucht [37; 40]. Dabei wurde ebenfalls eine *winged helix*-Faltung entdeckt [40].

Die NMR-Analysen zum RRM1 durch Alfano *et al.* ergaben Übereinstimmungen mit typischen RRM-Strukturen [37]. Diese zeichnen sich durch zwei α -Helices aus, welche ein β -Faltblatt umgeben, das aus vier antiparallel verlaufenden β -Strängen besteht [41]. Im Falle des RRM1 des humanen La Proteins existieren noch eine zusätzliche $\alpha 0$ -Helix am N-Terminus und eine $\alpha 3$ -Helix am C-Terminus, siehe (B) in Abbildung 3.

Weitere kristallografische Untersuchungen von La Peptiden haben gezeigt, dass der Übergang zwischen dem La-Motiv und dem RRM1 auch durch eine α -Helix beschrieben wird. Darüber hinaus wurde deutlich, dass sich die Grundstruktur beider Domänen in Anwesenheit von RNS nicht änderte. Entgegen der Kenntnisse zur RNS-Bindung durch *winged helix*-Motiven und RRMs sind im Falle des La Proteins nicht die sonst typischen Strukturelemente für die Substratbindung verantwortlich. Im La Protein bilden das La-Motiv und das RRM1 eine Bindetasche, was zur synergistischen Bindung von 3'-oligo-Uridin-RNS-Molekülen führt [42; 43].

In (C) der Abbildung 3 ist die NMR-Struktur des RRM2s wiedergegeben. Es weist eine als atypisch bezeichnete RRM-Struktur auf, da es anstelle eines viersträngigen, ein fünfsträngiges β -Faltblatt besitzt, sowie eine sehr lange zusätzliche C-terminale α -Helix ($\alpha 3$). Der Literatur ist außerdem zu entnehmen, dass es keine RNS-Moleküle binden kann [38].

1.4.2.2 Sequenzelemente von LaC

LaN und der N-terminale Anteil von LaC zeichnen sich durch die drei oben beschriebenen Domänen mit markanter Sekundärstruktur aus. Dem gegenüber wird der C-Terminus des La Proteins eher durch eine Abfolge von verschiedenen kurzen Sequenzelementen mit unterschiedlicher Funktion bestimmt, siehe Abbildung 4.

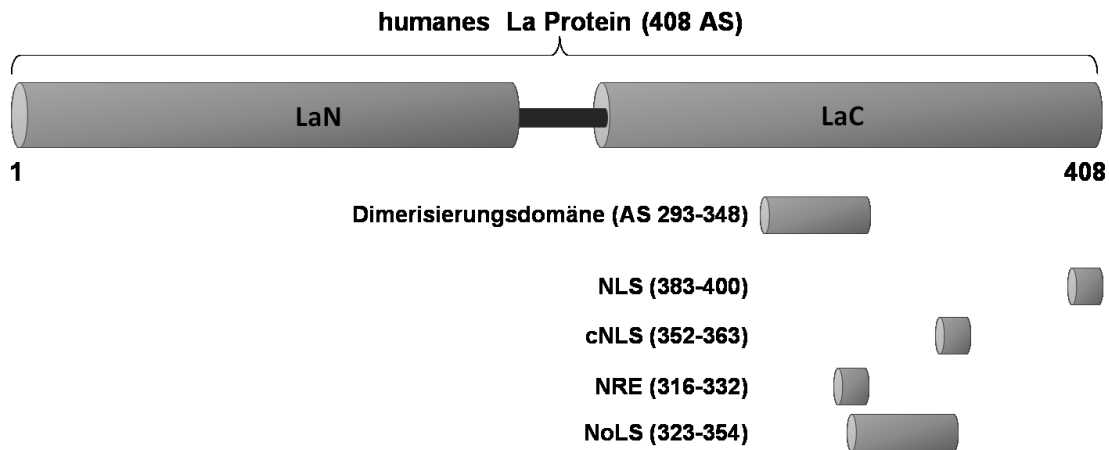


Abbildung 4: LaC mit Dimerisationsdomäne und Lokalisationssequenzen des La Proteins. LaC umfasst die Dimerisationsdomäne, sowie verschiedene Sequenzelemente, die entscheidend für die Lokalisation des La Proteins in der Zelle sind, so zum Beispiel das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) und ein kryptisches NLS (cNLS), sowie das nukleäre Retentionselement (NRE) und das nukleoläre Lokalisationssignal (NoLS).

Die helikale Struktur des Sequenzabschnittes AS 293 – 348 ist in der Literatur als Dimerisationsdomäne beschrieben [44; 45]. Nach Entdeckung dieser war es möglich zu erklären, warum es bei der Reinigung von rekombinantem La Protein immer wieder zu Produkten mit höherem Molekulargewicht als 48 kDa kam. Ein weiteres sehr entscheidendes Sequenzelement ist das nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Proteine, welche für die Erfüllung ihrer Funktion in den Zellkern wandern müssen, sind auf Grund ihrer Größe nicht in der Lage diesen Weg durch Diffusion zurückzulegen [46]. Sie müssen stattdessen aktiv durch den Kernporenkomplex transportiert werden, wobei Rezeptoren, die als Karyopherine bezeichnet werden, behilflich sind. So bindet zum Beispiel Karyopherin- α im Zytoplasma an das NLS des zu transportierenden Proteins. An Karyopherin- α kann anschließend Karyopherin- β assoziieren, welches den Transport in den Zellkern durch den Kernporenkomplex vermittelt. Die Karyopherine werden anschließend durch die Guanintriophosphat- (GTP-) gebundene Form der GTPase Ran vom transportierten Protein wieder abgespalten und wandern zurück ins Zytoplasma [47]. Das NLS selbst kann seiner Bestimmung nur nachkommen, wenn es am äußersten C-Terminus des Proteins lokalisiert ist [48; 49]. So weist selbst das verkürzte La Protein La₁₋₃₆₃ an dessen C-Terminus ein kryptisches NLS (cNLS, 352 - 363) auf [50]. Gegenspieler des NLS für einen aktiven Zellkernexport werden nukleäre Exportsignale (NESs) genannt. Solche Sequenzabschnitte sind in der Regel reich an Leucinen. Ihr kooperierender Rezeptor für den Export ist meist das Protein *chromosome region maintenance* 1 (Crm1) [51]. Es gibt Proteine, die sowohl über ein NLS als auch ein NES verfügen. Sie sind somit in der Lage stets zwischen Zytoplasma und Zellkern zu wandern [52]. Dieser Prozess wird auch als *Shuttling* bezeichnet. Auch für das La Protein ist ein solcher *Shuttling*-Prozess schon beschrieben worden [53; 54]. Jedoch verfügt das La Protein über kein NES. Sein Export ins Zytoplasma wird wahrscheinlich über

das nukleäre Retentionselement (NRE) im helikalen Sequenzabschnitt 316 - 332 bestimmt [38; 55–57]. Es wird beschrieben, dass Proteine mit NREs vermutlich über diese mit nukleären Faktoren interagieren und dadurch im Zellkern zurückgehalten werden. Kommt es jedoch zu post-translationalen Veränderungen der Beteiligten, führt dies zur Störung der Wechselwirkungen und das NRE tragende Protein wird ins Zytoplasma entlassen. Nach Bayfield *et al.* sind die AS K₃₁₆ und K₃₁₇ für die nukleäre Retention des La Proteins verantwortlich [57]. Das La Protein kann jedoch nicht nur zwischen Zytoplasma und Zellkern wandern, es wird auch in den Nukleoli transportiert. Dieser Transport wird durch das nukleoläre Lokalisationssignal (NoLS, AS 323 – 354) vermittelt [58].

1.4.2.3 Intrazelluläre Funktionen des La Proteins

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben dazu, welche Aufgaben das La Protein in der Zelle erfüllt. Entscheidend sind dabei die Interaktion des Proteins mit verschiedenen Ribonukleinsäuremolekülen (RNS), sowie die Lokalisation von La in der Zelle. Das humane La Protein ist unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Der Zellkern, als DNS beherbergendes Kompartiment und Ort der Gentranskription zur Generierung von mRNS, ist vom Zytoplasma, dem Ort der mRNS-Translation und Proteinbiosynthese durch die Kernhülle abgetrennt. Diese räumliche Trennung ist in eukaryotischen Zellen ein entscheidender Faktor für die Umsetzung der teilweise sehr komplexen und fein ausbalancierten Regulation der Genexpression.

Liegt das La Protein im Zellkern vor, so ist es in der Regel an RNS-Moleküle assoziiert. Die Bindung von RNS-Molekülen wird dabei durch die Phosphorylierung am S₃₆₆ begünstigt, welche durch die Proteinkinase CK2 ermöglicht wird [59]. Dem La Protein obliegt die Aufgabe, diese RNS-Moleküle vor dem Abbau durch RNasen zu schützen und als Chaperon für die richtige Faltung der RNS-Moleküle zu sorgen [60; 61]. Außerdem ist das La Protein für die nukleäre Retention verantwortlich, bis die RNS-Reifung vollständig abgeschlossen ist [23]. Zu den Ribonukleinsäuren, die von La gebunden werden, zählen unter anderem neu synthetisierte RNS-Polymerase III-Transkripte [62]. Diese weisen an ihrem 3'-Ende Oligouridinsequenzen auf, die durch das La Protein gebunden werden [63]. Während der Reifung und Prozessierung der RNS-Polymerase III-Transkripte kommt es zur Abspaltung dieser Uridinreste, wodurch die Assoziation mit dem La Protein aufgehoben wird [63–65]. Das La Protein hat damit einen Einfluss auf die Termination der Transkription von RNS-Polymerase III-Transkripten [15; 66; 67]. Weitere Substrate des La Proteins sind Vorläufer der 5S rRNS [68; 69], Transport-RNS (tRNS) [32], U6 *small nuclear* RNS (snRNS) [69], sowie humane Y RNS-Moleküle [70; 71]. Oft tritt La bei der Bindung an solche RNS Moleküle zusammen mit Ro60 und Ro52 in Erscheinung. Eine bessere Vorstellung davon vermittelt die schematische Darstellung in Abbildung 5.

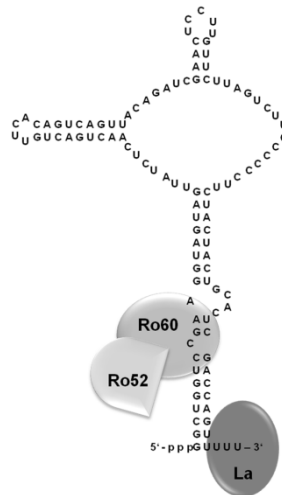


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Y1-RNP (adaptiert nach Itoh et al. 1992 [70] und Simons et al. 1996 [71]). Dargestellt ist die humane Y1-RNS mit den assoziierten La, Ro60 und Ro52 Proteinen.

Auch kleine virale RNS-Moleküle wie die des Adenovirus oder des Epstein-Barr-Virus werden durch La gebunden [72; 73]. Nach neuesten Erkenntnissen wirkt sich die Bindung von La auch förderlich auf die Expression von microRNS-Molekülen aus, da es an deren Vorläufer die pre-microRNS bindet [74].

Das La Protein kann jedoch nicht nur im Nukleoplasma vorkommen, sondern mit Hilfe der NoLS auch in die Nukleoli gelangen. Dort liegt es im Verbund mit Nukleolin vor und ist wahrscheinlich an der ribosomalen Biogenese beteiligt [75]. Voraussetzung für die Interaktion zwischen dem La Protein und dem Nukleolin ist, dass das S₃₆₆ unphosphoryliert vorliegt im Gegensatz zur phosphorylierten Variante im Nukleoplasma. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle würde die Interaktion stören.

Unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel Virusinfektion, UV-Strahlung oder Hitzeschock wandert La ins Zytoplasma und kann dort die Translation verschiedener Proteine beeinflussen. Dort kann es die Proteinbiosynthese weniger bestimmter Proteine fördern, während die klassische *Cap*-abhängige Translation herunter geregelt wird, ähnlich wie bei der Apoptose. Grundvoraussetzung für die *Cap*-unabhängige Translation ist das Vorhandensein von sogenannten internen Ribosomeneintrittsstellen, (IRES-Elemente) [76]. Diese vermitteln direkt das Zusammenfügen der ribosomalen Untereinheiten an der mRNS-Sequenz. Das La Protein ist in der Lage an solche Sequenzen zu binden und die IRES-abhängige Translation zu unterstützen. IRES-Elemente sind Bestandteil vieler Proteine, die Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen haben. Beispiele dafür sind das *murine double minute 2* Protein (MDM2), der *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) und das *human immunoglobulin heavy-chain binding protein* (BiP) [77–80]. Das La Protein ist außerdem in der Lage seine eigene IRES-abhängige Translation zu fördern [28; 81].

Darüber hinaus besitzen viele virale mRNS-Moleküle IRES-Elemente, sodass das La Protein auch deren Translation begünstigen kann. Dazu zählen mRNS-Sequenzen von Hepatitis C Virus, Poliovirus beziehungsweise Lentiviren und Oncoretoviren im Allgemeinen [82–86]. Untersuchungen von Craig *et al.* 1997 und Horke *et al.* 2002 weisen darauf hin, dass der AS-Sequenzabschnitt der Dimerisierungsdomäne (AS 293 – 348) einen erheblichen Einfluss auf die IRES-vermittelte Translation viraler RNS hat. So führten Deletionsversuche zu einer verminderten Translationsrate [44; 45]. Viren scheinen darüber hinaus das La Protein zu nutzen, um antivirale Abwehrmechanismen der Wirtszellen zu umgehen. Dabei bindet La an die viralen RNS-Moleküle und schützt diese vor den intrazellulären RNasen [87; 88]. Auf diese Weise begünstigt das La Protein die Virusreplikation.

Des Weiteren wird in der Literatur die Bindung von Einzelstrang-DNS (ssDNS) und Doppelstrang-DNS (dsDNS) erwähnt [89]. Die DNS-Bindung soll nach Castro *et al.* sogar gesteigert werden können, wenn das La Protein in Assoziation mit Calmodulin und in Ca^{2+} reichem Milieu vorliegt [89]. Zusätzlich wird auch eine potentielle Helicaseaktivität des La Proteins diskutiert. Dafür sprach die Identifizierung eines sogenannten *WalkerA*-Motivs (WAM, AS 333 – 339) im C-Terminus von La. Darüber soll das La Protein auch in der Lage sein Adenosintriphosphat (ATP) zu binden [17; 90–93]. Diese und weitere Strukturelemente sind in Abbildung 6 dargestellt.

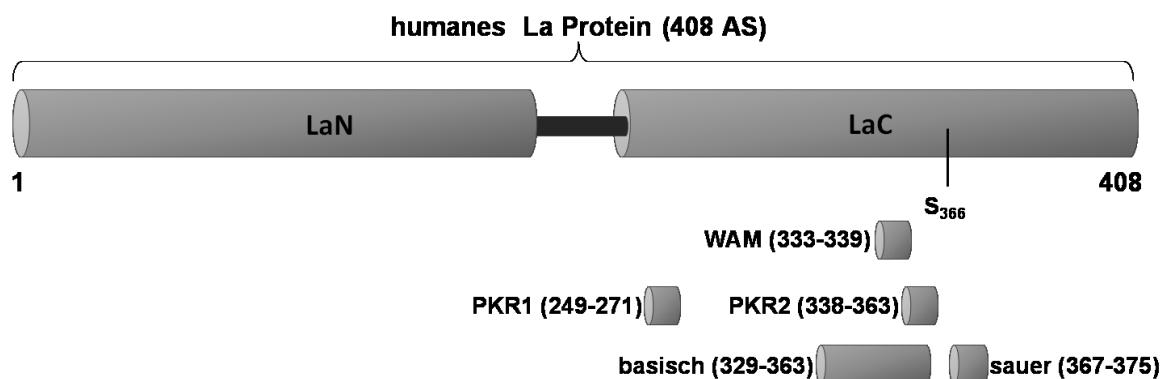


Abbildung 6: LaC mit weiteren potentiellen, funktionellen Elementen. Die Hauptphosphorylierungsposition S₃₆₆ als entscheidendes regulatorisches Element in LaC trennt zwei Aminosäurebereiche, welche sich durch das überwiegende Auftreten von basischen und sauren Aminosäuren auszeichnen. Des Weiteren sind die Lokalisation der potentiellen ATP-Bindestelle, dem *WalkerA*-Motiv (WAM), sowie zwei Sequenzabschnitte mit Homologien zu RNS abhängig aktivierbaren Proteinkinasen (PKR1 und PKR2) gezeigt.

1.4.4 Zelluläre Lokalisation des La Proteins

In den vergangenen 30 Jahren haben sich zahlreiche Studien mit der Lokalisation des La Proteins beschäftigt. Wie bereits oben geschrieben, liegt La unter physiologischen Bedingungen im Nukleoplasma oder in den Nukleoli des Zellkerns vor. Doch bereits Mattioli

und Reichlin fanden 1974 erste Hinweise darauf, dass das La Protein zuweilen auch im Zytoplasma auftreten kann [4]. Die ersten Belege für das *Shuttling* von La zwischen Zellkern und Zytoplasma, höchstwahrscheinlich bedingt durch das Zusammenspiel von NLS und NRE, wurden 1987 von Bachmann *et al.* veröffentlicht [53]. Dieses Erkenntnis wurde jedoch lange angezweifelt und das zytoplasmatische Auftreten des La Proteins mit Zellfraktionierung und einer schwachen Assoziation zwischen La und seinen nukleären Bindepartnern begründet [23]. Doch 2006 konnten Fok *et al.* mit Hilfe von Heterokaryonten-Experimenten den *Shuttling*-Prozess des humanen La Proteins nochmals bestätigen [94].

Eine Anreicherung des La Proteins im Zytoplasma war vor allem nach dem Einfluss unterschiedlicher Stressfaktoren zu beobachten. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Sauerstoffstress durch UV-Strahlung, virale Infektionen oder aber auch die Behandlung mit TNF α [95–99]. Das dadurch im Zytoplasma angereicherte La kann so die IRES-abhängige Translation von Proteinen induzieren und Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Bei besonders hoher Stressbelastung endet dies schließlich in der Apoptose der betroffenen Zellen. Im Rahmen der Untersuchungen zur zytoplasmatischen Anreicherung von La fanden Rutjes *et al.* 1999 auch erste Hinweise auf post-translationalen Modifikationen des La Proteins [100]. In ihren Studien beobachteten sie eine Dephosphorylierung des S₃₆₆ sowie eine Verminderung des Molekulargewichtes im Zusammenhang mit der zytoplasmatischen Anreicherung. Weitere Untersuchungen zeigen, dass wahrscheinlich Apoptose gekoppelte Proteasen dafür verantwortlich sind. So fanden sich in der AS-Sequenz des La Proteins verschiedene Schnittstellen für: die Caspase 3 nach D₃₇₄, Granzym B nach D₂₂₀ oder Granzym H nach F₃₆₄ [101–103]. Die Protease 3C des Poliovirus schneidet La nach Q₃₅₈ [104]. Auffällig ist, dass die Proteaseschnittstellen meist weit im C-Terminus gelegen sind. Das bedeutet, dass die funktionellen RNS-Bindedomänen erhalten bleiben, aber ein Verlust des NLSs zu beobachten ist. Als Folge davon verbleibt La im Zytoplasma, fördert weiter die Prozesse zur Apoptoseinduktion beziehungsweise steht den Viren für deren Replikation zur Verfügung.

Neben der La Lokalisation im Zellkern, den Nukleoli und dem Zytoplasma wurde La auch auf der Oberfläche von lebenden Zellen, apoptotischen Zellen oder assoziiert mit der extrazellulären Matrix detektiert. Umstritten ist zuweilen noch auf welchem Wege das La Protein zu diesen Präsentationsorten gelangt [95; 97; 98; 105; 106].

1.5 Monoklonale *anti*-La Antikörper

In den vergangenen 30 Jahren wurden für Untersuchungen des La Proteins zahlreiche monoklonale *anti*-La Antikörper (*anti*-La mAK) generiert und charakterisiert, ein großer Teil durch die Arbeitsgruppe (AG) um Herrn Prof. M. Bachmann [107–110]. Im Rahmen dieser *anti*-La mAK Entwicklung wurden Mäuse mit rekombinanten humanen La Protein mehrfach

immunisiert und die Milzzellen dieser Mäuse isoliert. Die Milzzellen wurden anschließend mit Myelomzellen fusioniert und die daraus entstandenen Hybridomazellen selektiert [Bachmann *et al.* (unveröffentlicht)]. Die Technik ist im Allgemeinen als Hybridomatechnik bekannt und gilt als Standardmethode zur Erzeugung monoklonaler AK (mAK) [9]. Die Abbildung 7 gibt einen Überblick die wichtigsten *anti*-La mAK.

Im Folgenden sollen die einzelnen *anti*-La mAK genauer vorgestellt werden. Grundlage dafür ist zum überwiegenden Teil die Dissertation von C. Franke aus der Arbeitsgruppe (AG) um Herrn Prof. Bachmann, welche 2009 an der TU Dresden erschienen ist und in der die Epitopbestimmung der einzelnen *anti*-La mAK ein wichtiger Bestandteil war [109].

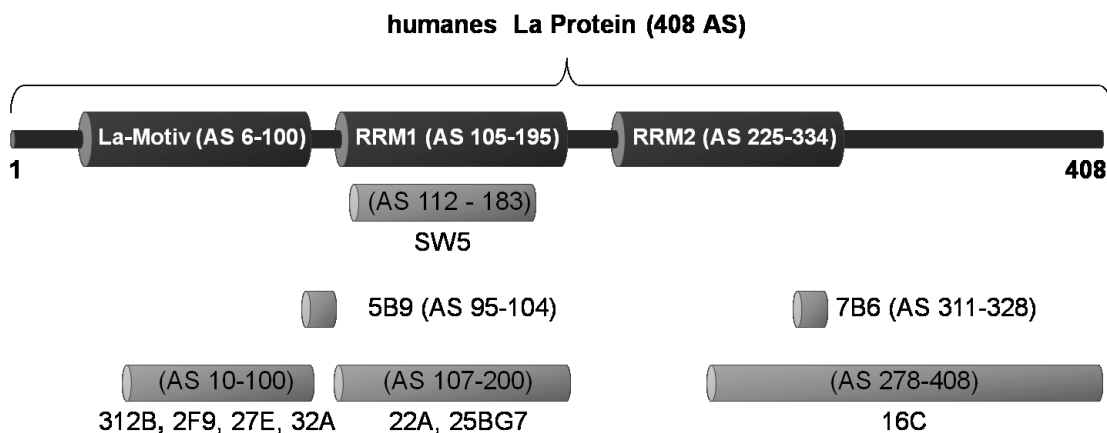


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Epitopbereiche der verschiedenen *anti*-La mAK. Dunkelgrau dargestellt ist die einfache Struktur des La Proteins, wie sie bereits in Abbildung 1 ausführlich beschrieben wurde. Darunter sind in hellgrau die Epitopbereiche der verschiedenen monoklonalen *anti*-La Antikörper (SW5, 5B9, 7B6, 312B, 2F9, 27E, 32A, 22A, 24BG7, 16C) dargestellt.

1.5.1 *Anti*-La mAK SW5

Einer der ersten *anti*-La mAK, welcher in der Literatur beschrieben wurde, war der SW5. Smith *et al.* charakterisierten und beschrieben 1985 den SW5 zusammen mit zwei weiteren *anti*-La mAK, dem SW1 und den SW3 [111]. Der in der hier vorliegenden Arbeit verwendete SW5 ist ein Immunglobulin vom Isotyp IgG2b und ist gegen ein Konformationsepitop in LaN, im AS-Bereich 112 – 183 gerichtet. Der SW5 ist außerdem dahingehend auffällig, dass er nur eine schwache Kreuzreaktion zu rekombinanten murinem La Protein aufweist, La in murinen Zellen jedoch nicht erkennt. Erfahrungen, welche bei vorangegangenen Arbeiten zum La Protein in der AG Bachmann gesammelt wurden, zeigten, dass der SW5 in der Lage ist, La ohne Beeinträchtigungen in Immunoblotanalysen, ELISA und in Zellfärbungsstudien nachzuweisen [109]. Daher wurde er in der vorliegenden Arbeit oft als vergleichender Kontrollantikörper in diversen Experimenten eingesetzt.

1.5.2 Anti-La mAK 5B9

Einer der wichtigsten *anti*-La mAK, welcher in der AG von Herrn Prof. Bachmann generiert wurden, ist der 5B9. Dieser sollte nicht mit dem aus der Literatur bekanntem *anti*-La mAK 3B9 verwechselt werden [112].

Bei dem *anti*-La mAK 5B9 handelt sich um ein Immunglobulin vom Isotyp IgG2a. Ihn zeichnet besonders die Fähigkeit aus, ein lineares Epitop in LaN zu erkennen. Dieses umfasst den AS-Bereich 94 – 104 mit folgender Sequenz: SKPLPEVTDEY. Jener Sequenzabschnitt ist deckungsgleich mit der flexiblen Linkerregion zwischen dem La-Motiv und dem RRM1. Auf Grund des hohen Konservierungsgrades dieses Proteinabschnittes kann der 5B9 mit den La Proteinen vieler Spezies kreuzreagieren, darunter auch dem murinen La Protein [109]. Der *anti*-La mAK 5B9 ist jedoch nicht ausschließlich interessant für die Erforschung des La Proteins. Er fand in den vergangenen Jahren zusammen mit seinem Epitopeptid (E5B9) Einzug in die Entwicklung von verschiedenen Immuntherapiestrategien gegen Tumore, wie das Prostatakarzinom oder myeloische Leukämie [113–117]. Außerdem erschienen erste interessante Ergebnisse für eine Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs), wie sie zukünftig bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder Transplantatabstoßungen verwendet werden könnten [110]. Für beide Anwendungsbereiche wurden Einzelkettenantikörperderivate entwickelt, welche auf der einen Seite eine Bindedomäne für die Erkennung der CD3-Komponente des CD3-T-Zellrezeptorkomplexes (CD3/TCR-Komplex) tragen. Über einen flexiblen *Linker* sind diese *anti*-CD3-Domänen mit einer Bindedomäne verbunden, welche das La Protein erkennen und vom *anti*-La 5B9 abstammt. Bei den Bindedomänen handelt es sich um Antikörperderivate, bestehend aus einer leichten und einer schweren Kette der variablen Domäne eines monoklonalen Antikörpers. Beide Ketten sind über Glycin-Serin-*Linker* miteinander verbunden und werden kurz als *single-chain fragments variable* (scFv) bezeichnet. Die kompletten bispezifischen Einzelkettenantikörperderivate werden als *single-chain bispecific tandem fragments variable* (scBsTaFv) bezeichnet [114]. Eine schematische Darstellung eines solchen scBsTaFvs bezüglich seines Aufbaus und seiner Fähigkeit zur Quervernetzung von Zellen ist in Abbildung 8 gezeigt. Der Darstellung ist zu entnehmen, dass diese Antikörperkonstrukte in der Lage sind, T-Zellen und La Protein dekorierte oder durch ein das Epitop E5B9 markierte Targetzellen miteinander quervernetzen. Daraufhin ergaben sich eine Aktivierung der T-Zellen, sowie die Freisetzung von Zytokinen und die spezifische Lyse der Targetzellen [114]. Im Falle der Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) war ein supressiver Effekt von Effektor-T-Zellen durch diese als Folge der Treg-Aktivierung zu beobachten [110].

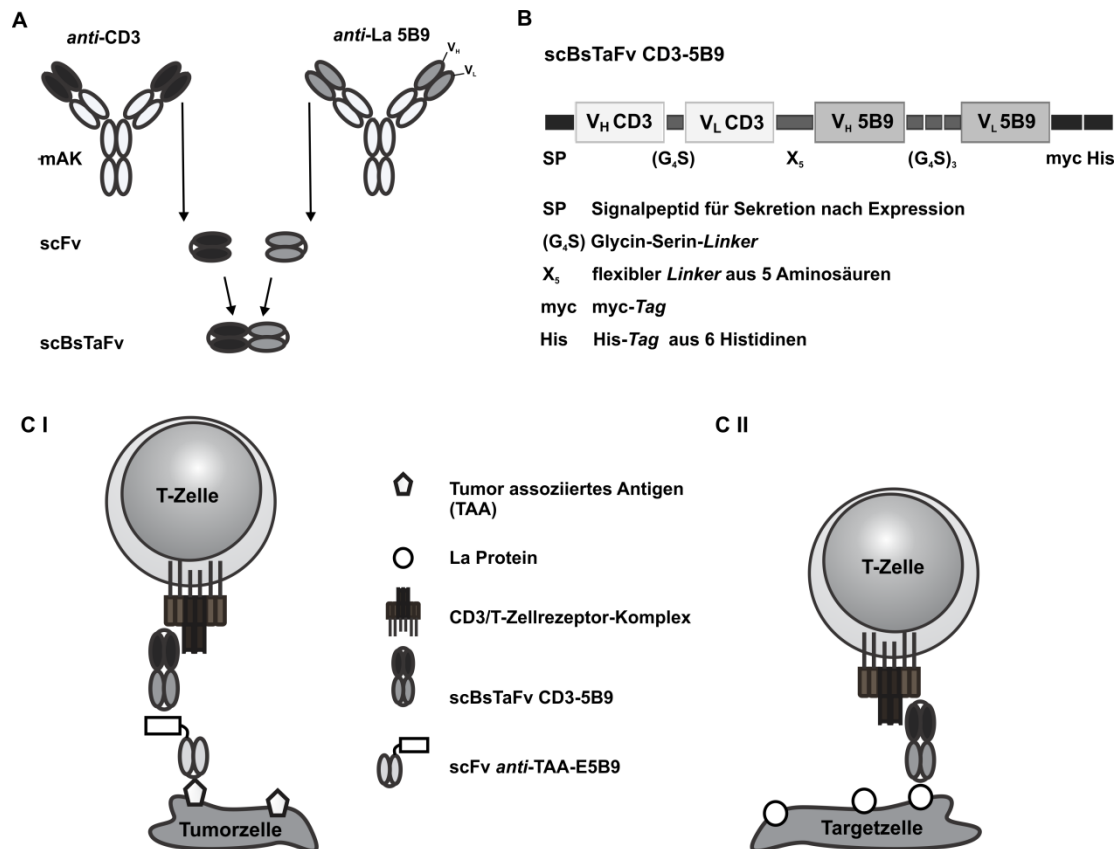


Abbildung 8: Verwendung von *anti-La 5B9* als Komponente in scBsTaFvs zur Quervernetzung von T-Zellen und Targetzellen (adaptiert an [114] und [110]). (A) Generierung eines scBsTaFv CD3-5B9 aus monoklonalen Antikörpern (mAK) *anti-CD3* und *anti-La 5B9*. (B) Schematischer Aufbau des scBsTaFv CD3-5B9 bestehend aus Signalpeptid (SP) für die Sekretion des Antikörperderivates in den Kulturüberstand nach Produktion in eukarotischen Zellen, schwerer, variablen Kette des *anti-CD3s* (V_H CD3), einem Glycin-Serin-Linker (G₄S) und der leichten, variablen Kette des *anti-CD3s* (V_L CD3). Daran schließen sich über einen flexiblen Linker aus fünf Aminosäuren die schwere, variable Kette des *anti-La 5B9* (V_H 5B9), ein dreifacher Glycin-Serin-Linker, die leichte, variable Kette *anti-La 5B9* (V_L 5B9), sowie ein myc- und ein His-Tag für Reinigung und Nachweisreaktionen an. (C) Zellquervernetzung von T-Zellen mit Targetzellen oder Tumorzellen über scBsTaFv CD3-5B9 und zelloberflächen gebundenen La Protein oder einem 5B9-Epitop (E5B9) tragendes Targetmodul (*anti-TAA-E5B9*) welches gegen ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) gerichtet ist.

1.5.3 *Anti-La* mAK 7B6

Ein weiterer *anti-La* mAK, welcher ein lineares Epitop erkennen kann, ist der 7B6. Dieses Immunglobulin vom Isotyp IgG1 bindet in LaC im AS-Abschnitt 295 – 344 mit folgenden Sequenz: EKEALKKIIEDQQESLNKW. Diese Region überlappt mit dem C-terminalen Ende des RRM2 (AS 225 - 334), der Dimerisationsdomäne (AS 293 - 348), sowie dem NRE (AS 316 - 332) und der potentiellen ATP-Bindestelle, dem *WalkerA*-Motiv (AS 333 – 339). Das 7B6 Epitop ist im Vergleich zum 5B9 Epitop länger und weniger stark konserviert. So zeigt der 7B6 auch keine Kreuzreaktion zu murinem La Protein, welches im Epitopzentrum durch einen AS-Austausch von (IE) zu (TD) kennzeichnet. Lediglich rekombinantes murines

La Protein konnte in Immunoblotanalysen schwach nachgewiesen werden [109]. Weitere Auffälligkeiten zeigten sich bei den ersten Fluoreszenzmikroskopieanalysen mit dem 7B6. So war der 7B6 nicht in der Lage, das La Protein in humanen Zellen unter physiologischen Bedingungen anzufärben. Wurden die Zelle jedoch zuvor mit Wasserstoffperoxid oder durch UV-Bestrahlung gestresst, so zeigte sich eine *anti*-La Färbung [109].

1.5.4 Anti-La mAK 312B, 2F9, 27E und 32A

Der *anti*-La mAK 312B (Isotyp IgG1) wird einer Gruppe von vier Immunglobulinen zugeordnet, welche alle in der AG von Herrn Prof. Bachmann generiert worden. Sie erkennen das La Protein im N-terminalen La-Motiv. Hier liegt ein Konformationsepitop vor, welches durch den AS-Sequenzabschnitt 10 – 100 bestimmt wird. Zu dieser Gruppe gehören neben dem 312B auch der 2F9 (Isotyp IgG1), der 27E (Isotyp IgG2b) und der 32A (Isotyp IgG1). Eine weitere Gemeinsamkeit, die dieser Gruppe zugesprochen wird, ist die deutlich bevorzugte Erkennung von reduziertem La Protein in Immunoblotanalysen und in ELISA-Studien [109]. In der hier vorliegenden Arbeit kamen bei dem einen oder anderen Experiment nur der 312B oder der 2F9 zum Einsatz. Beide sind auch in der Lage murines La Protein zu erkennen, der 312B besser als der 2F9. Des Weiteren zeichnet sich der 312B mAK durch ein gutes Immunpräzipitationsvermögen aus.

Der *anti*-La mAK 312B ist inzwischen auch kommerziell bei *Santa Cruz Biotchenology, Inc.* erhältlich und wurde zum Beispiel in Studien von Nitta *et al.* 2011 verwendet [118].

1.5.5 Anti-La mAK 22A, 24BG7 und 16C

Neben den bisher beschriebenen *anti*-La mAK wurden durch die AG um Herrn Prof. Bachmann weitere Antikörper generiert. Eine Gruppe von *anti*-La mAK erkennen dabei das RRM1 in LaN. Zu dieser Gruppe gehören der 22A und der 24BG7, beide vom Isotyp IgG1. Durch die Arbeit von C. Franke 2009 konnte die Epitopregion im AS-Bereich 107 – 200 ermittelt werden. Als wichtig für die Antigenerkennung haben sich dabei die AS-Seitenketten von D₁₀₇-K₁₆₆ und K₁₈₅-K₂₀₀ herausgestellt [109]. Beide mAK konnten ohne Einschränkungen das La Protein in Immunoblotanalysen, ELISA und in Zellfärbeexperimenten erkennen. Der 22A mAK ist inzwischen kommerziell bei *Santa Cruz Biotchenology, Inc.* erhältlich und wurde in Studien von Langley *et al.* 2010 und Perez-Leal *et al.* 2012 verwendet [119; 120]. Beide *anti*-La mAK kamen in der hier vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz und wurden nur der Vollständigkeit wegen an dieser Stelle erwähnt. Das Gleiche gilt für den 16C (Isotyp IgM), der rekombinantes humanes La Protein im C-terminalen Bereich, im AS-Abschnitt 278 – 408, erkennt [109].

Abschließend zur Betrachtung der existierenden *anti*-La mAK soll Tabelle 3 die wichtigsten Informationen und Eigenschaften dieser Antikörper zusammenfassen.

Tabelle 3: Eigenschaften der wichtigsten *anti*-La mAK.

<i>anti</i> - La mAK	Isotyp	Epitop im humanem La Protein	Kreuzreaktivität zu murinem La Protein		Immun- präzipitations- vermögen
			rekombinantes murines La	in murinen Zellen	
SW5	IgG2b	Konformationsepitop in LaN	(schwach)	-	+
5B9	IgG2a	linear (AS 94 -1 04) in LaN	+	+	-
7B6	IgG1	linear (AS 225 – 334) in LaC	(schwach)	-	-
312B	IgG1	Konformationsepitop im La- Motiv (AS 10 – 100)	+	+	+
2F9	IgG1		(schwach)	(schwach)	-
27E	IgG2b		+	+	+
32A	IgG1		-	-	-
22A	IgG1	Konformationsepitop im RRM1 (AS 107 – 200)	-	-	+
24BG7	IgG1		+	+	(schwach)
C16	IgM	Konformationsepitop (AS 278 – 408) in LaC	keine Angaben (k.A.)	k.A.	k.A.

1.6 Ausgangssituation zur Untersuchung der La Protein Redoxsensitivität

Die Erkenntnisse der Dissertation von C. Fanke aus dem Jahre 2009 [109] reflektieren am besten den Kenntnisstand zur Redoxsensitivität des La Proteins zu Beginn dieser Arbeit. Wie bereits in 1.5.3 und 1.5.4 erwähnt, zeichneten sich die *anti*-La mAK 7B6 und 312B durch besondere Färbereigenschaften gegenüber dem La Protein aus. Der *anti*-La 7B6 erkennt sein Epitop auf dem La Protein bei Zelfärbungsanalysen nur, nachdem die Zellen zuvor oxidativem Stress ausgesetzt waren. Dem gegenüber stehen die *anti*-La mAK der 312B Gruppe, siehe 1.5.4. Jene mAK erkennen nur reduziertes La Protein. Diese Erkenntnisse beschreiben eine potentielle, redoxabhängige Antigenerkennung durch die genannten mAK. Daher wurde vermutet, dass das La Protein unter verschiedenen Redoxzuständen eine unterschiedliche, räumliche Faltung aufweist, welche die Epitopzugänglichkeit beeinflusst. Ein möglicher Angriffspunkt für die Oxidation von Proteinen sind Cysteine. Durch Oxidation erhalten sie die Fähigkeit, Disulfidbrücken in und zwischen Proteinen auszubilden [121]. In der Aminosäuresequenz des La Proteins, dargestellt in Abbildung 9, lassen sich insgesamt drei Cysteine finden: C₁₈, C₂₃₂ und C₂₄₅.

1	MAENGDNEKMAALEAKI <u>C</u> HQIEYYFGDFNLPRDKFLKEQIKLDEGWVPLE	50
51	IMIKFNRLNRLTTDFNVIVEALSKSKAELMEISEDKTKIRRSKPLPEV	100
101	TDEYKNDVKNRSVYIKGFPTDATLDDIKEWLEDKGQVLNIQMRRTLHKAF	150
151	KGSIFVVFDSIESAKKFVETPGQKYKETDLLILFKDDYFAKKNEERKQNK	200
201	VEAKLRKQEQEAKQKLEEDAEMKSLEEKIG <u>C</u> LLKFSGDLDDQT <u>C</u> REDLH	250
251	ILFSNHGEIKWIDFVRGAKEGILFKEKAKEALGKAKDANNGNLQLRNKE	300
301	VTWEVLEGEVEKEALKKIIEDQQESLNKWKSKGRRFKGKGKGNKAAQPGS	350
351	GKGKVQFQGKKTKFASDDEHDEHDENGATGPVKRAREETDKEEPASKQQK	400
401	TENGAGDQ	408

Abbildung 9: Aminosäuresequenz des La Proteins. Die Primärstruktur des La Proteins ist dargestellt, wobei die drei Cysteine fett und unterstrichen hervorgehoben wurden.

In den folgenden Darstellungen der Abbildung 10 sind die räumlichen Umgebungen der drei Cysteine gezeigt. Das C₁₈ ist in der α 1 Helix des La-Motivs lokalisiert. Unter den reduzierenden Bedingungen, wie sie bei den NMR-Analysen gegeben sind, wird das Cystein und seine Seitenkette durch die α 2 Helix des La-Motives scheinbar verdeckt, siehe Abbildung 10 (B). Die beiden C-terminalen Cysteine liegen in der Region des RRM2. Dabei ist das C₂₃₂ vor dem β 1 Strang positioniert und C₂₄₅ repräsentiert die erste Aminosäure der α 1 Helix des RRM2s, siehe Abbildung 10 (C). Diese beiden Cysteine werden, unter den Bedingungen der NMR-Analysen, durch das fünfsträngige β -Faltblatt räumlich voneinander getrennt. Auf Grund dessen erscheinen potentielle Wechselwirkungen, wie sie bei der Bildung einer Cysteinbrücke zwischen jenen beiden Aminosäuren auftreten würden, eher unwahrscheinlich.

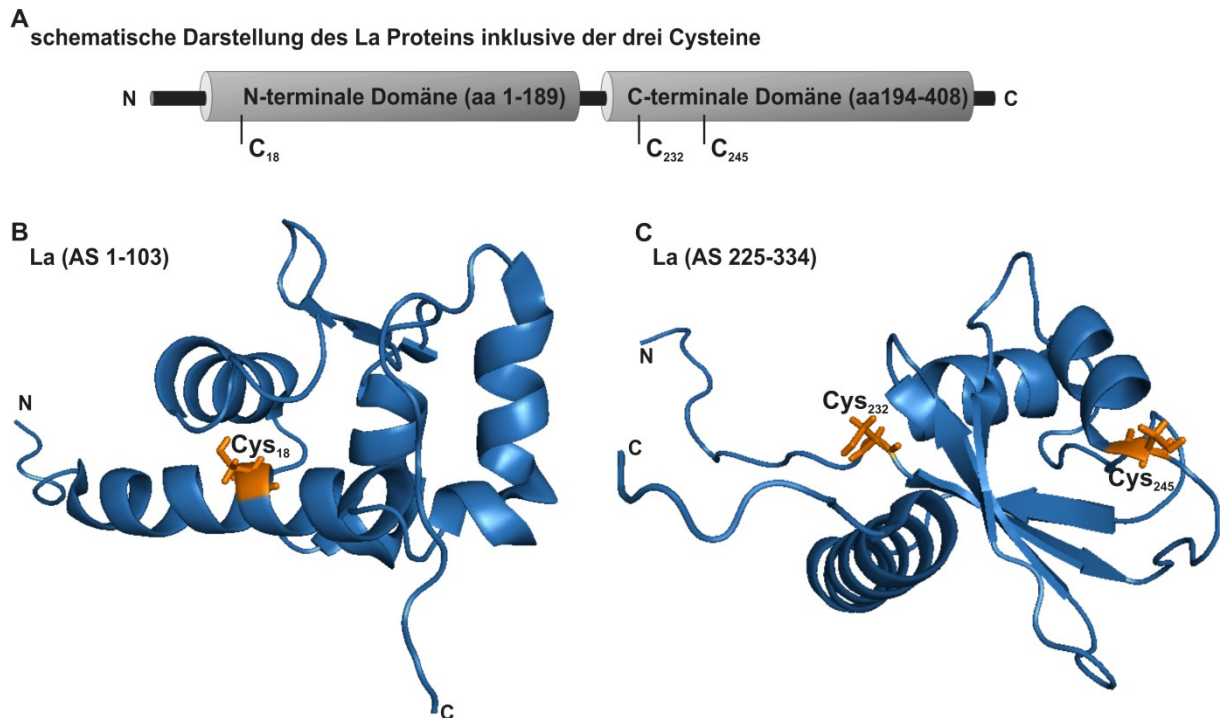


Abbildung 10: Räumliche Umgebung der Cysteine im La Protein. (A) Die schematische Darstellung zeigt das La Protein inklusive der drei Cysteine. (B, C) Die Strukturmodelle zeigen die Cysteine (gelb) in ihrer räumlichen Umgebung (AS 1 - 193 und AS 225 - 334) innerhalb des La Proteins (blau) liegend.

1.7 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe die Redoxsensitivität des La Protein im Zusammenhang mit seiner Proteinstruktur, Funktionalität, Antigenität und Zelllokalisierung zu untersuchen. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- I. Sind die drei Cysteine (C₁₈, C₂₃₂ und C₂₄₅) für die Redoxsensitivität verantwortlich? Zeigt sich deren Einfluss im Bezug auf die Proteinstruktur, Dimerisation und Oligomerisation? Die Klärung dieser Fragen soll mit Hilfe neu generierter Cysteinmutanten des La Proteins analysiert werden.
- II. Beeinflussen die drei Cysteine die Sekundärstruktur und die Schmelztemperatur des La Proteins?
- III. Inwiefern ist der Redoxzustand des La Proteins für die Erkennung durch *anti*-La mAK wie den 312B oder den 7B6 von Bedeutung? Können die bisherigen Erkenntnisse mit Hilfe der neu generierten Cysteinmutanten bestätigt und eventuell erweitert werden?

- IV. Lässt sich eine redoxabhängige Antigenerkennung auch bei Autoantikörpern in Seren vom Patienten mit SLE oder Sjögren's Syndrom erkennen?
- V. Wird die Bindung von Nukleinsäuren (ssRNS, dsRNS und DNS-RNS-Hybriden) durch die Cysteine beeinflusst?
- VI. Bei C. Franke 2009 ist zu lesen, dass oxidativer Stress, hervorgerufen durch UV-Bestrahlung oder H_2O_2 , zu einer zytoplasmatischen Anreicherung des La Proteins in Zellen führt. Ist dieser Sachverhalt auf weitere Stimuli, welche das intrazelluläre Level reaktiver Sauerstoffspezies (kurz ROS) erhöhen, übertragbar? Zu untersuchen ist der Einfluss von $Cu(II)SO_4$, $Fe(II)Cl_2$ oder den Stickstoffmonoxiddonor NO-Glutathion.
- VII. Stickstoffmonooxid (NO) kommt auch als natürlicher Botenstoff in Zellen vor. Sein intrazellulärer Pegel kann unter anderem auch rezeptorabhängig, zum Beispiel in dendritischen Zellen (DCs), durch *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und den nachgeschalteten NF κ B-Signalweg beeinflusst werden. Kann eine TLR-abhängige Stimulation zur zytoplasmatischen Anreicherung des La Proteins führen?
- VIII. In der Literatur wird die Translokation des La Proteins auf die Oberfläche von Zellen kontrovers diskutiert. Kann eine Translokation von La zur Zelloberfläche durch die Behandlung mit verschiedenen Sauerstoffstressstimuli, siehe VI, erreicht werden? Oder erfolgt eine Dekoration lebender Zellen mit La nur nach Apoptose oder Nekrose von La-Donorzellen? In welchem Redoxzustand liegt zelloberflächengebundenes La Protein vor?
- IX. Welche Bedeutung kann zelloberflächengebundenes La Proteinen für das Immunsystem haben? Zu untersuchen ist der Einfluss auf professionelle, antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie zum Beispiel DCs, als wichtige Akteure des Immunsystems.
- X. Wie sind die erhaltenen Ergebnisse im Zusammenhang mit den Autoimmunkrankheiten SLE oder Primären Sjögren's Syndrom zu bewerten?

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Das verwendete Verbrauchsmaterial ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
BD Falcon™ 5 ml Rundbodenröhrchen, Polysterol	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Combitips (2,5 ml; 5 ml; 50 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckgläschen (24 x 24 mm; 24 x 60 mm)	Hecht-Assistent, Sondheim
Dialysemembran (Ausschlussgröße 25 kDa)	Medicell International Ltd, London, UK
DURAN® ISO Laborflaschen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml; 0,2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS-Messröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier Whatman 3 MM	Bender & Hobein, Bruchsal, Deutschland
Glaswolle (steril)	Supelco, Sigma- Aldrich, Steinheim
Greiner-Reaktionsröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kryo-Einfriergefäße	Nalgene Company, Rochester, NY USA
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nitrocellulose Membrane Hybond™-C extra	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Petrischale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PVDF Membran	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Qiaquick™ Ni-NTA Spin Columns	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen (5 ml; 20 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter (0,45 µm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
8 Well sticky-µ-Slide	Ibidi GmbH, Martinsried, Germany
8 Well-µ-chamber-slide	Nunc Brand Products, Roskilde, Dänemark

96 Well-ELISA-Platten	Nunc Brand Products, Roskilde, Dänemark
96 Well-Flachbodenplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
96 Well-Platten-Abdeckfolien	<i>nicht mehr nachvollziehbar</i>
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6 Well; 12 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (Ø 15 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.2 Geräte und Software

Die verwendeten Geräte und Computerprogramme sind nachfolgender Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Auflichtmikroskop Olympus CK2	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine Bethesda, MD USA
Biofuge primoR	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
Brutschränke	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
BD Cell Quest Pro Software	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Calibur flow cytometer	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
ChemiDoc XRS Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Eismaschine Scotsman AF 10	SCOTSMAN, Mailand, Italien
Einhängethermostat Polystat cc1	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg, Deutschland
Eppendorf® BioPhotometer®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
GelDocXRSsystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MACS Quant® Analyzer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	Ikamag RH Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Milenia Kinetic Analyser (ELISA-Reader)	Milenia Biotec, Bad Nauheim, Deutschland
Mini Protean 3 SDS-Gelelektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Neubauer-Zählkammer	LO-Labortechnik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Pipettboy	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter S40 – SevenMulti™ pH	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Präzisionswaage Ohaus Explorer® Pro	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Quantity one 4.6.8	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Schüttelinkubator INFORS HF	Infors, Bottingen, Schweiz
SDS-PAGE-Kammern	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spannungsgeräte PowerPac™ 1000, 300 und Universal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sterilbank HeraSafe®	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TransBlot™ Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
UV VIS Spektrophotometer SPECORD® PC200	Jena Analytik AG, Jena, Deutschland
Vacuubrand – CVC 2000	VACUUBRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Vacuubrand – RZ 2	VACUUBRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Vakuumpumpe	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortexschüttler VF2	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
VWR Galaxy Mini Microliterzentrifuge	GENEO BioTechProducts GmbH, Hamburg, Deutschland
Waage Sartorius BP221 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wippschüttler Reax 3	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Tabelle 6: Computerprogramme & Analysesoftware

Software	Bezugsquelle
„AxioVision Release“ Version 4.8. (06-2010)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
„BZ Analyzer II“ (Version 1.0)	Keyence Microscope Europe, München, Deutschland
„Flowing Software“ (Version 2.5.0)	entwickelt von Perttu Terho, Universität Turku, Finnland
„GIMP“ (Version 2.8.0)	lizenzfreies, freierhältliches Bildbearbeitungsprogramm
„GraphPadPrism®“ (Version 5.01)	GraphPad Software Inc.
„ImageJ“ (Version 1.47)	entwickelt von Rasband, W.S.

MACSQuantify™ Software	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
„Magellan“ (Version 6.6)	Tecan
„Microsoft Excel 2007“ (Version 12.0)	Microsoft Cooperation
„VectorNTI“ (Advance 9 Software)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Zusammensetzungen verschiedener Lösungen und Puffer sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie bzw. Reagenz	Bezugsquelle
Acrylamid-Stammlösung 30 % Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bicoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Bisacrylamid-Stammlösung 2 % Rotiphorese® Gel B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbü Biotechnik GmbH, Gaiberg, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-4-Toluidin-Salz (BCIP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland
Butanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Buthioninsulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Coomassie-Brilliant-Blau G250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DIG Wash and Block Buffer Set (Blockierungsreagenz für Western Blot)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Eindeckelmedium mit DAPI AKLIDES ANACplus	MediPAN, Dahlewitz, Deutschland
Essigsäure, 97–99 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Material

Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Escherichia coli 026:B6; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Mangandichlorid Tetrahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Mikrozyd [®] AF liquid	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 %	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
OptiPhase SuperMix (Szintillationsflüssigkeit)	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau – Rügesheim, Deutschland
Orange-G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
„phosphate-buffered saline“ (PBS)-Trockensubstanz	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti [®] -Blot A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Blot K	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Resiquimod®	ENZO® Life Science GmbH, Lörrach, Deutschland
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure, 95–97 %	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
Tris Ultra Qualität (Tris-Base)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, Deutschland
Trypanblaulösung	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Tween20	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland

Tabelle 8: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

Puffer	Zusammensetzung
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O
Anodenpuffer	10 % (v/v) Roti® Blot A, 20 % (v/v) Methanol in ddH ₂ O
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O in ddH ₂ O
APS	10 % (w/v) in ddH ₂ O
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % DMF
Blockierungslösung	5 % (v/v) Blockierungsstammlösung in TBS-T
Blockierungsstammlösung	10 % (w/v) DIG Wash and Block Buffer Set (Blockierungsreagenz) in Maleinsäurepuffer durch Autoklavieren lösen
BSA-Stammlösung	10 mg/ml BSA in PBS
BSO-Lösung	1 mM BSO in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	2,5 g/l Coomassie-Brilliant-Blau G250 in Coomassie-Entfärbelösung
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
EDTA/PBS-Arbeitslösung	1 mM EDTA in PBS
ELISA-Beschichtungspuffer	8,4 g/l NaHCO ₃ , 3,56 g/l Na ₂ CO ₃ in ddH ₂ O, pH 9,5
ELISA-Blockierungslösung-1	5 % (v/v) Magermilchpulver in 1x PBS-Lösung
ELISA-Blockierungslösung-2	10 % (v/v) FKS in 1x PBS
ELISA-Substratpuffer-1	24,4 mM Citronensäure-Monohydrat, 55,6 mM Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O in ddH ₂ O, pH 5,0
ELISA-Substratpuffer-2	1 Tetramethylbenzidin-Tablette, 3 µl H ₂ O ₂ , 10 ml ELISA-Substratpuffer-1
ELISA-Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS-Lösung

Material

HEPES	1 M in ddH ₂ O, pH 7,2 mit NaOH einstellen; sterilfiltriert
Imidazol-Elutionslösung	350 mM Imidazol, 150 mM NaCl in PBS-Lösung
Imidazol-Waschlösung-1	10 mM Imidazol, 150 mM NaCl in PBS-Lösung
Imidazol-Waschlösung-2	20 mM Imidazol, 150 mM NaCl in PBS-Lösung
Katodenpuffer	10 % (v/v) Roti [®] -Blot K, 20 % (v/v) Methanol in ddH ₂ O
LPS	0,1 µg/µl in DMSO
Lysozymlösung	10 mg/ml Lysozym, in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5)
Natriumacetat-Lösung	2,5 M Natriumacetat in ddH ₂ O, pH 5,2 mit Essigsäure einstellen
NBT/BCIP-Lösung	50 µl NBT-Lösung, 37,6 µl BCIP-Lösung in 10 ml AP-Puffer
NBT-Lösung	77 mg/ml NBT in 70 % DMF
6x Orange-G-Ladepuffer	1,5 mg/ml Orange-G, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 % (v/v) Glycerin
PBS/EDTA-Lösung	1 mM EDTA in PBS-Lösung
1x PBS	9,55 g/l PBS in ddH ₂ O
10x PBS	95,5 g/l PBS in ddH ₂ O
PEI-Lösung	1 mg/ml in ddH ₂ O; sterilfiltriert
Propidiumiodid-Lösung	1 µg/µl PI in 1x PBS
Resiquimod-Lösung	3,144 mg/ml (10 µM) in DMSO
RNase-Lösung (Plasmid-Minipräparation)	2 mg/ml RNase A, 800 U/ml T1, 15 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 15 min bei 100 °C inkubieren
10x SDS-Laufpuffer	1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, 250 mM Tris-HCl (pH 8,3)
2x SDS-Probenpuffer	10 mM DTT, 6 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerin, 80 µg/ml Bromphenolblau, 187 mM Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Trenngelpuffer	0,5 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
STET-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 5 % (v/v) Triton X-100
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 5,7 % (v/v) Essigsäure
20x TBS-Puffer	0,2 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,5 mit HCl einstellen
1x TBS-T-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
Transformationspuffer-1 (TFB-1)	30 mM MnCl ₂ · 4 H ₂ O, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O, 15 % (v/v) Glycerin in ddH ₂ O, pH 5,8; sterilfiltriert

Transformationspuffer-2 (TFB-2)	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O, 15 % (v/v) Glycerin in ddH ₂ O, pH 6,8; sterilfiltriert
Triton X-Lösung	5 % Triton X-100 in PBS
Trypsin/EDTA-Arbeitslösung (Zellkultur)	1x Trypsin/EDTA in PBS

2.4 Enzyme und Enzypuffer

Die verwendeten Enzyme und Enzypuffer sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 9: Verwendete Enzyme und Enzypuffer

Enzym bzw. Enzypuffer	Bezugsquelle
10x Buffer Orange	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10x Buffer Red	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Not</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Pst</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
5x Rapid Ligation Buffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
RNase T1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.5 Kit-Systeme

Die verwendeten *Kit*-Systeme sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Verwendete *Kit*-Systeme und deren Bezugsquellen

Kit-System	Bezugsquelle
Advantage HF 2 PCR <i>Kit</i>	Clontech, Laboratories, Inc, CA USA
Cytofix Buffer <i>Kit</i>	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

DNA Clean & Concentrator TM – 5 <i>Kit</i>	Zymo Research, Orange, CA USA
DNA Recovery Kit	Zymo Research, Orange, CA USA
Invisorb Plasmid Midi <i>Kit</i> Invitex	Invitex, Berlin, Deutschland
OptEIA Human TNF α -ELISA <i>Kit</i>	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
pGEM [®] -Teasy Vector System I	Promega Corporation, WI USA
QIAquick Gel Extraction Kits (50)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation <i>Kit</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.6 Molekulargewichtsmarker

Die verwendeten Molekulargewichtsmarker sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Verwendete Molekulargewichtsmarker und deren Bezugsquellen

Molekulargewichtsmarker	Bezugsquelle
GeneRuler TM DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.7 Vektoren

Die verwendeten Vektoren sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Verwendete Vektoren und deren Bezugsquellen

Vektor	Bezugsquelle
pEGFP-C1	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a-La _{C18} A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a-La _{C232} A _{C245} A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a-La _{C18} A _{C232} A _{C245} A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a-LaC	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland

pET28a-LaC_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a-LaN	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pET28a-LaN_C ₁₈ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pGEM®-Teasy	Promega Corporation; WI USA
p6NST70-MCS	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
p6NST70-La wt	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
p6NST70-La_C ₁₈ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
p6NST70-La_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
p6NST70-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
p6NST70-EGFP-La wt	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
p6NST70-EGFP-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pSecTag2B®	eukaryotischer Expressionsvektor Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pSecTag2B-La wt	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
pSecTag2B-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Sequenzierprimer und Oligonukleotide zur Generierung der La Cysteinmutanten und La Fragmente, welche von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen wurden, sind in nachfolgenden Tabellen (13 und 14) zusammengefasst. Nach Anlieferung wurden die lyophilisierten Oligonukleotide bei Raumtemperatur (RT) in sterilem ddH₂O gelöst, wobei die Konzentration auf 100 pmol/μl eingestellt wurde. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 13: Verwendete Primer für Sequenzierungen zur Kontrolle von Klonierungsereignissen

Sequenzierprimer		Sequenz (5'→3')
BGHpolyA	<i>reverse</i> (r)	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
T7 promotor	<i>forward</i> (f)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
CMV promotor	<i>forward</i> (f)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
EGFP	<i>forward</i> (f)	ATG GTC CTG CTG GAG TTC GT

Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide und Oligonukleotidprimer für die Amplifikation von La Proteinfragmenten und Generierung der La Cysteinmutanten durch PCR

Oligonukleotide		Sequenz (5'→3')
La (ApaI)	<i>reverse</i> (r1)	GGG CCC AGC GGC CGC CTG GTC TCC AGC ACC ATT TTC
LaC_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	<i>forward</i> (f1)	TCT AGA AGA AAA GAT TGG AGC CTT GCT GAA ATT TTC GGG TGA TTT AGA TGA TCA GAC CGC CAG A
La (NheI)	<i>forward</i> (f2)	GCT AGC TAT TCC GGA ATG GCT GAA AAT GGT GAT AAT
LaC	<i>forward</i> (f3)	GCT AGC ACC ATG GAA TCT CTA GAA GAA AAG
La_C ₁₈ A	<i>forward</i> (O1)	CTA GCT ATT CCG GAA TGG CTG AAA ATG GTG ATA ATG AAA AGA TGG CTG CCC TGG AGG CCA AAA TCG CCC ATC AAA TTG AGT
La_C ₁₈ A	<i>forward</i> (O2)	ATT ATT TTG GCG ACT TCA ATT TGC CAC GGG ACA AGT TTC TAA AGG AAC AGA TAA AAC TGG ATG AAG GCT GGG TAC
La_C ₁₈ A	<i>reverse</i> (O3)	ATG GGC GAT TTT GGC CTC CAG GGC AGC CAT CTT TTC ATT ATC ACC ATT TTC AGC CAT TCC GGA ATA G
La_C ₁₈ A	<i>reverse</i> (O4)	CCA GCC TTC ATC CAG TTT TAT CTG TAA TTT AGA AAC TTG TCC CGT GGC AAA TTG AAG TCG CCA AAA TA TAC TCA ATT TG

2.9 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Verwendete Antikörper und deren Bezugsquellen

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>mouse anti</i> -Penta-His IgG1	1:1000	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Maus <i>anti</i> -human La IgG2b (Klon SW5)	Hybridomaüberstand unverdünnt; reiner mAK (5 µg/ml)	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
Maus <i>anti</i> -human La IgG2a (Klon 5B9)	Hybridomaüberstand unverdünnt; reiner mAK (5 µg/ml)	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland

Maus <i>anti</i> -human La IgG1 (Klon 7B6)	Hybridomaüberstand unverdünnt; reiner mAK (5 µg/ml)	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
Maus <i>anti</i> -human La IgG1 (Klon 312B)	Hybridomaüberstand unverdünnt; reiner mAK (5 µg/ml)	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
Maus <i>anti</i> -human La IgG2b (Klon 2F9)	Hybridomaüberstand, unverdünnt	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
goat F(ab') ₂ <i>anti</i> -mouse IgG (Fcγ ₁)-Alexa488	1:400	Immunotech, Marseille, Frankreich
goat F(ab') ₂ <i>anti</i> -mouse IgG (Fcγ ₁)-Alexa647	1:400	Immunotech, Marseille, Frankreich
goat F(ab') ₂ <i>anti</i> -mouse IgG (Fcγ ₁)-PE	1:400	Immunotech, Marseille, Frankreich
rabbit <i>anti</i> -mouse IgG-AP	1:1000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
rabbit <i>anti</i> -mouse IgG-HRP	1:2000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

2.10 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften sowie Bezugsquellen

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
HEK293T wt	humane embryonale Nierenzelllinie HEK293, stabile Expression des „SV40 large T-Antigen“, adhären	ATCC CRL 11268, Manassas, VA USA
HEK293T hTLR4	humane embryonale Nierenzelllinie HEK293, stabile Expression des „SV40 large T-Antigen“, adhären, stabile Oberflächenexpression von humanen Toll-like-Rezeptor (TLR4)	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
HeLa wt		Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
A9	adhärente murine Fibroblasten	ATCC CRL 6319, Manassas, VA USA
3T3	adhärente murine Fibroblasten	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
Jurkat	T-Zelllinie	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
Daudi	B-Zelllinie	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland

Radji	B-Zelllinie	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland
YTS	NK-Zelllinie	Prof. Bachmann, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Deutschland

2.11 Primäre Zellen

2.11.1 Primäre periphere mononukleäre Blutzellen und dendritische Zellen (DCs)

Die Isolierung primärer, peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) erfolgte aus Vollblut unterschiedlicher Spender (Kapitel 2.4.4). Die Blutspenden wurden vom Deutschen Roten Kreuz Blutspendedienst (Dresden) oder über freiwillige Spender des Instituts für Immunologie (Medizinische Fakultät, TU Dresden) bezogen.

Dendritische Zellen wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmitz (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden) isoliert und zur Verfügung gestellt. SlanDCs wurden mit Hilfe von magnetischen Beads aus frisch isolierten PBMCs gewonnen [122; 123]. Aus Monozyten herangezogene dendritische Zellen (moDCs) wurden aus frisch isolierten Monozyten gewonnen, welche unter bestimmten Kultivierungsbedingungen zu immaturen moDC ausdifferenzierten [124] und teilweise für spätere Versuche bei –20 °C aufbewahrt wurden.

2.11.2 Primäre Endothelzellen (HUVEC)

Die Isolation und Aufnahme in Kultur erfolgte durch eine kooperierende Arbeitsgruppe. Primäre Endothelzellen wurden aus Nabelschnüren durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Morawitz (Medizinische Fakultät, Bereich Gefäßendothel / Mikrozirkulation, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden) isoliert und freundlicher Weise für Versuche zur Verfügung gestellt [125; 126].

2.12 Bakterienstämme

Die *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien der Stämme TOP10F' und BL21 wurden von der Firma Statagene (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Die Genotypen sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Genotyp des verwendeten *Escherichia coli* Bakterienstammes

Bakterienstamm	Genotyp
TOP10F'	F' ⁺ {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)} mcrA Δ(mrr -hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
BL21 (DE3) pLysS	F'ompT hsdBS(r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dem (DE3) pLysS (Can ^R)

2.13 Grundmedien, Medienzusätze und Zusammensetzung verschiedener Kultivierungsmedien

Die verwendeten Grundmedien und Medienzusätze sind nachfolgenden Tabellen (18 und 19) zu entnehmen, die Zusammensetzung verschiedener Medien für die Kultivierung von Bakterien und Zellen sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 18: Verwendete Grundmedien

Kulturmedium	Bezugsquelle
RPMI 1640 Medium	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
DMEM + GlutaMaxTMI (4,5 g/l D-Glucose, Pyruvat)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 19: Verwendete Medienzusätze

Medienzusatz	Bezugsquelle
Ampicillin	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, Deutschland
Bacto™ Agar	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ USA
Bacto™ Tryptone	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ USA
Bacto™ Yeast (Hefeextrakt)	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ USA
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10 g/ml)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEA, 100x)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Stabiles Glutamin (N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 200 mM)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Tabelle 20: Zusammensetzung verschiedener Kultivierungsmedien

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB)-Agar	15 g/l Bacto™ Agar in LB-Medium
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto™ Tryptone, 0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast (Hefeextrakt), 0,5 % (w/v) NaCl, in ddH ₂ O, pH 7,2
2x YT-Medium	1,2 % (w/v) Bacto™ Tryptone, 1 % (w/v) Bacto™ Yeast (Hefeextrakt), 1 % (w/v) NaCl in ddH ₂ O, pH 7,2, 20 mM MgSO ₄ (nach Autoklavieren zugeben), 10 mM KCl (nach Autoklavieren zugeben),
DMEM _{Standard} Medium	DMEM + GlutaMaxTMI (4,5 g/l D-Glucose, Pyruvat), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 % (v/v) FKS
RPMI _{Standard} Medium	RPMI 1640 Medium, 2 mM stabiles Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % (v/v) NEA, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 % (v/v) FKS
RPMI _{HS} Medium	RPMI 1640 Medium, 2 mM stabiles Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % (v/v) NEA, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 % (v/v) Humanserum (AB)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezielle Mutanten des La Proteins durch Klonierung erzeugt. Dafür waren verschiedenste molekularbiologische Techniken und Verfahren notwendig, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

3.1.1 Gezielte Generierung von DNS-Fragmenten

3.1.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) bezeichnet man die exponentielle Amplifikation bestimmter DNS-Fragmente. Dafür wird zunächst die Ausgangs-DNS, welche auch als Matrize bezeichnet wird, auf 95 °C erhitzt. Das dadurch bedingte Aufschmelzen des DNS-Doppelstrangs ist die Voraussetzung dafür, dass kurze Oligonukleotide, sogenannte *Primer*, an die Ausgangs-DNS binden können. Mit Hilfe einer zugefügten DNS-Polymerase und freien Desoxyribonukleotiden (dNTPs) werden dann neue, zur Matrize komplementäre, DNS-Stränge in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Durch wiederholtes Erhitzen auf 95 °C werden die Doppelstränge abermals aufgeschmolzen und ein weiterer Zyklus aus *Primer*-Bindung (*annealing*), DNS-Synthese und DNS-Doppelstrang-Trennung erfolgt. Durch diese Methode nimmt die Anzahl von DNS-Molekülen durch jeden Synthese-Zyklus exponentiell zu. Besonders wichtig bei der Anwendung einer PCR sind hitzestabile Polymerasen, wie zum Beispiel die *Taq*- oder die *Phu*-Polymerase.

Die DNS-Amplifikationen für die Klonierung der verschiedenen La Proteinmutanten fanden unter Verwendung des Advantage[®] HF 2 PCR Kits (BD Bioscience Clontech, Heidelberg, Deutschland) statt. Ein PCR-Ansatz beinhaltete in der Regel 2,5 µl Matrizen-DNS, je 2,5 µl 10 µM *forward* und *reverse* Primer, 2,5 µl Kit-dNTPs und ebenso viel Kit-Puffer. Des Weiteren wurden 0,5 µl der Kit-Polymerasemischung zugefügt. Abschließend wurden die PCR-Ansätze mit 12,5 µl ddH₂O auf ihr endgültiges Volumen im PCR-Gefäß aufgefüllt.

Zu Beginn der PCR-Zyklen wurde die DNS für eine Minute auf 95 °C erhitzt, wodurch sie denaturiert wurde. Es folgte eine Inkubation von 40 Sekunden bei optimaler Hybridisierungstemperatur für das Anlagern der *Primer* an die DNS-Matrize. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 90 Sekunden bei 68 °C inkubiert. Dadurch konnte die DNS-Polymerase, ausgehend von den *Primern*, die komplementären DNS-Stränge in 5'-

3'-Richtung amplifizieren. Mit diesem Reaktionsschritt war der erste Zyklus der PCR abgeschlossen. Nach Beendigung von insgesamt 35 Zyklen wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 68 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

Nach Abschluss der PCR wurde die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und die PCR-Produkte elektrophoretisch von der Matrizen-DNS, sowie den *Primern* getrennt und isoliert (siehe 3.1.3 und 3.1.4). Danach wurden die Produkte als eine Art Zwischenspeicherung in *pGEM[®]T-Easy-Vector* ligiert (siehe 3.1.5.1).

3.1.1.2 *Oligoannealing – Verbinden von Oligonukleotiden*

Unter *Oligoannealing* versteht man das Verbinden von Oligonukleotiden, die in ihrer DNS-Sequenz komplementär sind. Für diese Methode wurden je 200 µl der entsprechenden Oligonukleotide mit 4 µl Puffer R (Fermentas, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) und 32 µl ddH₂O gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Mischung auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz auf 0,5 pmol/µl mit ddH₂O verdünnt und stand für die Ligation in den gewünschten Zielvektor zur Verfügung.

3.1.2 Restriktionsverdau von DNS

3.1.2.1 *Präparativer Restriktionsverdau von DNS für die Klonierung neuer DNS-Konstrukte*

Mit Hilfe des präparativen Restriktionsverdaus konnten gezielt DNS-Fragmente von einem Vektorsystem in ein anderes überführt werden. Anwendung fand diese Methode zum Beispiel beim Transfer der DNS-Sequenz für das La Protein von einem Klonierungsvektor, wie pSecTag2b in pET28a, ein Vektor für die prokaryotische Expression in *Escherichia coli*.

Bei dieser Methode wurden in der Regel 5 µg DNS des Ausgangsplasmids eingesetzt. Dieser DNS wurden der Klonierungsstrategie folgend Restriktionsenzyme zugegeben, sowie der enzumentsprechende Puffer, der letztlich 1x in der Mischung vorlag. Restriktionsenzyme und deren dazugehörige Puffer wurden stets von der Firma Fermentas (Fermentas, Thermi Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Insgesamt betrug das Volumen eines solchen Ansatzes 20 µl. Um dieses zu erlangen, wurde die fehlende Menge durch die Zugabe von ddH₂O ausgeglichen. Der Restriktionsverdau wurde stets unter der für die Enzyme optimalen Temperatur durchgeführt, das heißt bei 37 °C auf einem Heizblock für eine Dauer von einer Stunde. Ausnahmen wurden bei der Verwendung der Restriktionsenzyme *Xba* I und *Sfi* I gemacht. Für eine gute Restriktionseffizienz bei dem Gebrauch von *Xba* I wurde die Inkubationszeit

auf zwei Stunden verlängert, da Methylierungen der DNS deren Verdau durch dieses Enzym beeinträchtigten. Die Verwendung von *Sfi* I zeichnete sich durch dessen optimale Arbeitstemperatur von 50 °C aus.

Nach einem Restriktionsverdau von Plasmid-DNS wurde für die Trennung der einzelnen DNS-Fragmente eine Gelelektrophorese über ein Agarosegel (siehe 3.1.3) angeschlossen. Um letztlich das gewünschte DNS-Fragment zu isolieren, musste dieses noch aus dem Gel herausgeschnitten und gereinigt werden (siehe 3.1.4).

Unter Umständen war es notwendig, einen mehrstufigen Restriktionsverdau durchzuführen. Grund dafür waren in der Regel Restriktionsenzyme, welche in unterschiedlichen Puffern oder bei verschiedenen Temperaturen arbeiten. Für den letzteren Fall wurden präparative Verdau unmittelbar in Reihe geschaltet. Waren zwei verschiedene Puffer notwendig, dann wurde zunächst ein präparativer Verdau durchgeführt, die DNS mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte Zwischenprodukt gereinigt. Danach wurde der zweite Restriktionsverdau angeschlossen, ebenfalls mit anschließender DNS-Fragmentreinigung.

3.1.2.2 Analytischer Restriktionsverdau von DNS

Die Methode des analytischen Restriktionsverdaus wurde zur Prüfung des Erfolges einer Klonierung eingesetzt. Dafür wurden zunächst *in silico* ein oder mehrere Restriktionsenzyme bestimmt, welche ein charakteristisches Bandenmuster des durch die Klonierung erhaltenen DNS-Plasmids ergaben. Dabei sollte sich das Bandenmuster des Ausgangskonstruktes und des Klonierungsergebnisses möglichst unterscheiden. Für diese *in silico* Analysen wurde das Programm „Vector-NTI®“ (Version 9, *Life Technologies*™, Thermo Fisher Scientific) genutzt.

In einem analytischen Restriktionsverdau wurden etwa 3-5 µg DNS bzw. 5 µl DNS aus einer Mini-Präp (siehe 3.1.6.1) verwendet. Dieser DNS wurden 0,5 µl des entsprechenden Enzyms und 1 µl des zugehörigen 10x Puffers zugegeben. Anschließend wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt und die Probe für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die dadurch entstandenen DNS-Fragmente wurden schließlich mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.3) aufgetrennt, sodass das erhaltene Bandenmuster analysiert werden konnte.

3.1.3 Elektrophoretische Trennung von DNS-Fragmenten unterschiedlichen Molekulargewichtes

DNS-Fragmente wurden in einem Agarosegel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies war durch Anlegen eines elektrischen Feldes möglich. Innerhalb eines solchen

elektrischen Feldes wandern negativ geladene Nukleinsäuren zur positiv geladenen Elektrode. Das Agarosegel dient dabei als Matrix, durch welche Moleküle geringer Größe schneller hindurch wandern als Moleküle mit hohem Molekulargewicht. So unterscheiden sich verschieden große Moleküle nach ihrer zurückgelegten Laufstrecke innerhalb des Agarosegels, bezogen auf die Dauer der elektrischen Auftrennung und der angelegten Spannung. Dadurch entstehen spezifische Bandenmuster für DNS, welche einem gezielten Restriktionsverdau unterzogen wurde.

Im Speziellen wurde Agarose (0,8 % w/v) in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Für das spätere Anfärben der DNS, wurde nach leichtem Abkühlen der Lösung der Farbstoff GelRed™ (zugefügt (3 µl/100 ml Gel) und das Gel auf einem Schlitten für eine horizontale Gelkammer (Sub-Cell® GT Agarosegel-Elektrophoresesystem) gegossen. Für die Elektrophorese wurden die DNS-Proben in 6x Orange-GPuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNS fand schließlich in 1x TAE-Puffer, bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand statt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der einzelnen Banden wurde bei der Agarosegelelektrophorese der Marker GenRuler® Ladder Mix von der Firma Fermentas mitgeführt. Anschließend konnten die Proben mit Hilfe des Biostep UV-Transilluminator (BioRad, München, Deutschland) detektiert und betrachtet werden.

3.1.4 Isolation von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel

Mit Hilfe des *QiaQuick Gel Extraction Kits* (QIAGEN, Hilden) war es möglich DNS-Fragmente aus einem Agarosegel zu extrahieren.

Dafür wurde zunächst die gewünschte DNS-Bande mittels eines Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Zugabe des QG-Puffers in der Menge des dreifachen Gelvolumens wurde die Probe für 10 min bei 50 °C schüttelnd inkubiert, um die Gelmatrix vollständig aufzulösen. Anschließend wurde ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben und die Probe auf eine, dem Kit zugehörige, Säule überführt. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 13'000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf 5415C, Rotor-Nr.: 34151) konnte der Durchfluss verworfen werden. Zum Waschen, der an die Säulenmatrix gebundenen DNS, wurden 750 µl PE-Puffer des Kits auf die Säule gegeben und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschrilles wurde die Säule in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und mit 50 µl ddH₂O für 2-5 min inkubiert. Die DNS wurde dann durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 13'000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf 5415C, Rotor-Nr.: 34151) von der Säule eluiert.

3.1.5 Ligation von DNS-Fragmenten

3.1.5.1 Ligation von PCR-Produkten in den pGEM[®]T Easy-Vector

Um gereinigte PCR-Produkte (siehe 3.1.1) für weitere Arbeiten zu nutzen, wurden sie zunächst in den *pGEM[®]T Easy-Vector* (Promega, Mannheim, Deutschland) integriert. Die daraus resultierenden Plasmide dienten nach weiteren Prüfungen, Plasmid-Amplifikation, sowie Reinigung (siehe 3.1.6) als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungsschritte.

Für die Ligation wurden 1 µl des *pGEM[®]T Easy-Vectors*, 3 µl des gereinigten PCR-Produkts, 2 µl T4-Puffer, 1 µl T4-Ligase und 3 µl ddH₂O zusammenpipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für die Transformation von *Escherichia coli* (Stamm: Top10F') eingesetzt (siehe 3.2.2.), welche wiederum für eine Blau-Weiß-Selektion auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen wurden.

3.1.5.2 Gerichtete Ligation von isolierten DNS-Fragmenten in Plasmide

Voraussetzung für eine gerichtete Ligation eines linearisierten Zielvektors und eines speziellen DNS-Fragments waren kompatible Enden. Diese sollten aus geeigneten präparativen Restriktionsverdau hervorgegangen sein.

Für die Ligation wurden in der Regel 1 µl linearisierte Vektor-DNS, 3 µl Insert-DNS, 2 µl 5x Ligations-Puffer, 1 µl T4-Ligase und 3 µl ddH₂O eingesetzt. Dieser Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurde für eine Stunde bei RT inkubiert.

Alternativ wurde auch das *Rapid Ligation* Kit der Firma Fermentas verwendet. Dabei wurden 1 µl linearisierte Vektor-DNS, 3 µl Insert-DNS mit 2 µl 5x *Rapid Ligation* Puffer und 1 µl *Fast-Ligase* sowie 3 µl ddH₂O gemischt. Unter Verwendung dieses Kits verkürzte sich die Ligation, ebenfalls bei RT, auf 15 min.

Unabhängig von der Art der gerichteten Ligation wurde der gesamte Ligationsansatz anschließend für die Transformation von *Escherichia coli* (Stamm: Top10F') eingesetzt. Die transformierten Bakterien wurden wiederum auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und selektioniert (siehe 3.2.2 und 3.2.3).

3.1.6 DNS-Präparation aus Bakterien

3.1.6.1 DNS-Präparation aus Einzelklonkulturen zur anschließenden Überprüfung eines Klonierungserfolgs (Mini-Präparation)

Für die Isolation von DNS aus 5 ml Bakterienkulturen wurde ein modifiziertes Protokoll der DNS-Präparation nach Holmes und Quigley (1981) verwendet.

Zunächst wurden dafür 5 ml LB-Medium mit 5 µl Antibiotikum zur Selektion der gewünschten Bakterienklone versetzt. Als Antibiotikum kamen meist Ampicillin [100 mg/ml Stocklösung] oder Kanamycin [50 mg/ml Stocklösung] zum Einsatz. Den so vorbereiteten Medien im 15 ml Greinerröhrchen wurde Bakterienmaterial einer Einzelzellkolonie von einer Bakterienagarplatte zugeführt. Über Nacht, beziehungsweise über einen Zeitraum von etwa 16 Stunden wurden die Bakterien bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 165 rpm kultiviert.

Als Ausgangsmaterial für die Mini-Präparation dienten letztlich 2 ml der Bakterienkultur. Diese wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für eine Minute bei 13'000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf 5415C; Rotor-Nr.: 34151) abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 350 µl STET-Puffer (1 mM NaCl, 100 mM Tris, 10 mM Triton X100) resuspendiert. Anschließend wurde ein Mix aus 25 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) und 1 µl RNase A-Lösung (2 mg/ml RNase A in 100 mM Tris/HCl, 15 mM NaCl, pH 7,5) bereitet, welcher der Probe zugefügt wurde. Für den Aufschluss der Bakterien wurden die Proben für 40 s bei 95 °C inkubiert und im Folgenden für 10 min bei RT und 12'000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf 5415C, Rotor-Nr.: 34151) zentrifugiert. Das entstandene Pellet aus denaturiertem Protein und Zellfragmenten wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNS wurde mit 40 µl 2,5 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 420 µl Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT, um die DNS zu fällen, wurde die Probe für 5 min bei 4 °C und 12'000x g (Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 12153) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, die pelletierte DNS mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und die Probe abermals, wie oben beschrieben, kalt zentrifugiert. Nach Abnahme der Waschlösung wurde die DNS luftgetrocknet und abschließend in 50 µl TE-Puffer, durch gründliches Resuspendieren, aufgenommen.

Die so isolierte Plasmid-DNS wurde anschließend in einem analytischen Restriktionsverdau (siehe 3.1.2.2), zur Kontrolle des Klonierungserfolgs, im Detail untersucht.

3.1.6.2 DNS-Präparation aus einer 100 ml Bakterienkultur zur Gewinnung eines gewünschten DNS-Plasmids (Midi-Präparation)

Wurde nach einer Mini-Präparation (siehe 3.1.6.1) mit anschließenden analytischen Restriktionsverdau (siehe 3.1.2.2) ein Bakterienklon ermittelt, welcher das gewünschte Klonierungsergebnis zeigte, so folgte eine gezielte Plasmid-Produktion und Isolation.

Ausgangsmaterial für eine solche Midi-Präparation war eine 100 ml Bakterienkultur des gewünschten Klons. Dabei wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µl Antibiotikum (100 mg/ml

Ampicillin oder 50 mg/ml Kanamycin) versetzt und mit 100 µl Kultur aus der vorangegangenen Mini-Kultur beimpft.

Für die Midi-Präparation selbst wurde das Invisorb® Plasmid Midi Kit der Firma Invitex (Berlin, Deutschland) genutzt. Zur Bakterienernte wurde die Kultur auf zwei 50 ml Greiner-Röhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 4 °C und 6'000 rpm (Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 19176) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in 4 ml Kit-Puffer I resuspendiert und mit 50 µl RNase A versetzt. Es folgte die Zugabe von 8 ml Kit-Puffer II und eine Inkubation bei RT für 5 min. Von dem Kit-Puffer III wurden ebenfalls 8 ml zugegeben und für weitere 5 min, diesmal auf Eis, inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 4 °C und 10'000 rpm (Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 19176) zentrifugiert und durch einen Sterilfilter in ein frisches Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 8 ml DNS-Bindpuffer wurde die Probe auf einen an ein Vakuum (130 mbar) angeschlossenen Spinfilter gegeben und abgesaugt. Dieser wurde mit 10 ml Wasch-Puffer PL gewaschen und für 20 min durch das angelegte Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Spinfilter in ein Greiner-Röhrchen überführt, mit 500 µl Elutionspuffer benetzt und für 10 min inkubiert. Danach wurde die DNS-Probe durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10'000 rpm (Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 19176) von der Säule eluiert.

3.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNS-Plasmiden

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Spektrophotometer „SmartSpec™ 3000“ (Biorad, München).

3.1.8 Überprüfung einer DNS-Präparation auf Reinheit und DNS-Qualität

Um Verunreinigungen von DNS-Präparaten durch RNS auszuschließen, wurde 1 µg der isolierten Probe auf eine Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld für ca. eine halbe Stunde aufgetrennt (siehe 3.1.3). RNS-Verunreinigungen wären gegebenenfalls als unscharfe Bande im niedermolekularen Bereich sichtbar geworden. Anhand des Bandenmusters war es außerdem möglich, die Qualität der Probe zu prüfen. Diese wurde als gut befunden, wenn die Plasmide ausschließlich in zirkulärer und *supercoiled* Konformation vorlagen, erkennbar am charakteristischen Bandenmuster. Weniger optimal für weiteres Arbeiten wären Plasmide in linearer Konformation, bedingt durch Einzelstrangbrüche, gewesen.

3.1.9 DNS-Sequenzierung

Zum Abschluss einer Klonierung wurde die gewonnene DNS sequenziert. Dafür wurden 0,7 – 1 µg DNS-Plasmid und 20 pmol eines entsprechenden Primers eingesetzt. Die Sequenzierungen selbst wurden durch die Firma „SeqLab“ aus Göttingen durchgeführt.

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Generierung kompetenter Zellen

Zur Erzeugung kompetenter Zellen des Bakterienstammes *Escherichia coli* (Stamm Top10^F) wurden zunächst Kolonien von einer LB-Mediumplatte gepickt und über Nacht in 2 ml 2x YT-Medium bei 37 °C im Schüttelinkubator herangezogen. Am nächsten Morgen wurden diese Kulturen (1:100) im gleichen Medium verdünnt und die Bakterien bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Die war erreicht, wenn für die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,5 gemessen werden konnte. Danach wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt, auf 15 ml Greiner-Röhrchen verteilt und für 5 min bei 4 °C und 5'000 rpm (Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 19176) pelletiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden die Bakterien in 10 ml Transformationspuffer I resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren, so wie oben beschrieben, wurden die Pellets in 2 ml Transformationspuffer II resuspendiert und in einem Stickstoffbad tiefgefroren. Bis zur Verwendung wurden die Bakterien in Form von 50 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation kompetenter *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen

Für die Transformation kompetenter *Escherichia coli* Bakterien wurden diese zunächst auf Eis langsam aufgetaut. Danach wurde DNS, zum Beispiel der komplette Ansatz einer Plasmid-Ligation (siehe 3.1.5), zugeführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationsphase sollte die DNS an die Bakterienwand assoziieren. Durch den darauf folgenden Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 1,5 - 2 min sollten DNS-Plasmide von den Zellen aufgenommen werden. Nun wurden den Bakterien 950 µl LB-Medium zugeführt, bevor sie für eine Stunde bei 37 °C auf dem Heizblock geschüttelt wurden. Abschließend wurden die Bakterien auf Kultivierungs-Agarplatten ausgestrichen. Dafür wurden Agarplatten aus antibiotikaversetztem LB-Medium genutzt. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem enthaltenen Resistenzgen auf dem zugefügten Plasmid der transformierten Bakterien.

3.2.3 Anlegen von Kryo-Kulturen

Für das Anlegen von Kryo-Kulturen eines speziellen Bakterienklons wurden 450 µl einer entsprechenden Kultur mit einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 entnommen und mit 1 ml LB-Medium-Glycerol-Mix (1:1) versetzt. Diese Proben wurden dann bei -80 °C eingefroren.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinsynthese mit Hilfe von *Escherichia coli*

Das La Protein, sowie dessen durch Klonierung generierte Variationen, wurden mit Hilfe der Proteinsynthese durch Bakterien und anschließender Proteinreinigung (siehe 3.3.2.1) gewonnen. Als exprimierende Zellen wurden *Escherichia coli* Bakterien des Stammes BL21 (DE3)pLysS und das pET28a-Vektorsystem genutzt.

3.3.1.1 Testkulturen zur Ermittlung eines Bakterienklons mit möglichst hoher Expressionseffizienz

Vor dem erstmaligen Ansetzen einer Hauptkultur zu Synthese großer Proteinmengen jeder einzelnen La Proteinvariante wurde zunächst auf einen Bakterienklon mit hoher Expressionseffizienz selektioniert. Dafür wurden nach vorangegangener Transfektion (siehe 3.2.2), Vorkulturen mit je 5 ml LB-Medium mit 5 µl 50 µg/ml Kanamycin (Endkonzentration 50 ng/ml) sowie Bakterienmaterial einer Einzelzellkolonie herangezogen. Das Bakterienmaterial wurde mit einer sterilen Pipettenspitze von der jeweiligen kanamycinhaltigen LB-Platte entnommen und den Vorkulturen zugeführt. In der Regel wurden pro La Proteinvariante fünf bis sechs Vorkulturen für etwa 16 h, meist über Nacht, bei 37 °C und 160 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Im Folgenden wurden mit Hilfe von 250 µl dieser Vorkulturen die eigentlichen Testkulturen herangezogen, ebenfalls mit 5 ml LB-Medium plus 50 ng/ml Kanamycin. Die Bakterien wurden schließlich bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 kultiviert und die Genexpression der einzelnen La Proteinvarianten durch Zugabe von IPTG, auf eine Endkonzentration von 1 mM, gestartet. Nach der Weiterkultivierung über einen Zeitraum von vier Stunden wurden die Bakterien pelletiert (5 min, 6'000 rpm, 4°C, Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 19777) und der Überstand verworfen. Bis zur Proteinexpressionsanalyse am Folgetag wurden die Bakterienpellets bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Bakterienklons mit der besten Expressionseffizienz wurden die gewonnen Bakterienpellets in 400 µl Lysepuffer (10 mM Imidazol, 150 mM NaCl in 1x PBS) resuspendiert und abzentrifugiert (10 min, 10'000 rpm, 4°C, Zentrifuge: Sigma 3K30, Rotor-Nr.: 19777). Die Überstände wurden in frische 1,5 ml Eppendorf-Tubes

überführt. Abschließend wurden die Überstände mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe 3.3.3) und weiterführenden Westernblot-Analyse (siehe 3.3.5), unter Verwendung eines *anti-La*-Hybridomaüberstandes (5B9) in Kombination mit dem *rabbit anti-mouse-IgG-AP*-Antikörpers, genauer untersucht.

Die Testkultur des am besten exprimierenden Bakterienklons war anschließend Ausgangsmaterial für die Hauptkultur und das Anlegen von Kryo-Kulturen (siehe 3.2.4.3).

3.3.1.2 *Kultivierung von Bakterien zu Gewinnung großer Proteinmengen*

Für die Synthese von größeren Mengen Proteins jeder La Proteinvariante wurde eine 800 ml Hauptkultur herangezogen. Dafür wurde zunächst eine Startkultur mit 20 ml LB-Medium plus 50 ng/ml Kanamycin, mit 20 µl Testkultur bzw. Bakterienmaterial steril entnommen aus einer Kryo-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Mit 8 ml dieser Startkultur wurden die Hauptkulturen aus 800 ml LB-Medium plus 50 ng/ml Kanamycin beimpft. Diese wurden herangezogen bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Anschließend erfolgte der Expressionsstart für die gewünschten Proteine durch die Zugabe von 800 µl 1M IPTG (Endkonzentration 1 mM). Für eine Expressionsdauer von 4,5 h wurden die Bakterienansätze weiterhin bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Schließlich wurden die Bakterien abzentrifugiert (15 min, 6'000 rpm, 4°C, Zentrifuge: Eppendorf 5415C, Rotor-Nr.: 19777) und bei -20 °C bis zur Proteinreinigung gelagert, während der Überstand verworfen wurde.

3.3.2 Proteinreinigung nach prokaryotischer Expression

3.3.2.1 *Zellaufschluss*

Um die Bakterien einer 800 ml Kultur aufzuschließen, wurden deren Pellets zunächst auf Eis aufgetaut und 20 ml Lysepuffer zugegeben. Nach dem vollständigen Resuspendieren der Pellets wurden 20 µl 10 mg/ml Lysozymlösung zugesetzt und die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Zum Schutz der zu reinigenden Proteine wurden anschließend 200 µl 0,1 M Serin-Proteaseinhibitor (PMSF) zugesetzt. Für eine vollständige Lyse der Bakterien wurden diese drei- bis viermal für eine Minute mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 250; 40 % Duty Cycle, Output Control 4 [Branson, Dietzenbach, Deutschland]). Zwischen den einzelnen Behandlungszyklen wurden die Proben stets auf Eis gestellt, um die zu reinigenden Proteine vor hitzebedingter Denaturierung zu schützen.

Anschließend wurden die Lysate abzentrifugiert (20 min, 10'000 rpm, 4°C, Zentrifuge: Eppendorf 5415C, Rotor-Nr.: 19777), um die Zelltrümmer der Bakterien abzutrennen. Der Überstand, der Vollextrakt, wurde in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt.

Für einen Teil von La Proteinen wurde an dieser Stelle ein DNS-RNS-Verdau durchgeführt, um eventuelle an La Protein gebundene Nukleinsäuren zu entfernen. Dafür wurden 10 ml Vollextrakt 30 µl RNase-Mix (2 mg/ml RNase A und 800 U/ml RNase T) und 30 µl 10 mg/ml DNase I zugesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte, wie für alle La Proteine, die Reinigung mittels Nickelaффinitätschromatographie.

3.3.2.2 *Proteinreinigungen mittels Nickelaффinitätschromatographie*

Für die Reinigung mittels Nickelaффinitätschromatographie wird die Eigenschaft von Nickelionen (Ni^{2+}) ausgenutzt, Chelatkomplexe bilden zu können. Die an eine Säulenmatrix gekoppelten und mit Nitrilotriessigsäure komplexierten Ni^{2+} -Ionen können mit den Imidazolringen von Histidinen interagieren. Somit ist es möglich, gewünschte Proteine mit zusätzlichen Histidinen, sogenannte His-Tag-markierte Proteine, an die Säulenmatrix binden zu lassen und von unmarkierten Proteinen zu trennen.

Vor der Reinigung war es notwendig eine passende Nickelaффinitätssäule zu präparieren. Dafür wurde zunächst einer 5 ml Einmalspritze der Kolben entfernt und sterile Glaswolle mit Hilfe einer Pinzette in den Spritzenzylinder gestopft. Um die Luft aus den Zwischenräumen der Glaswolle zu verdrängen, wurde diese mit demineralisiertem Wasser angefeuchtet. Anschließend wurden die Spritze mit einem Stopfen verschlossen und 1,5 ml der Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose-Suspension (Ni-NTA-Agarose, Qiagen, Hilden, Deutschland) tropfenweise auf die feuchte Glaswolle aufgeschichtet. Nach Sedimentation der festen Phase wurde der Stopfen an der Spritzenspitze wieder entfernt und die wässrige Phase der Nickel-Agarose-Suspension konnte heraustropfen. Die so gepackte Säule wurde anschließend mit 10 ml 1x PBS equilibriert und gleichzeitig die Tropfgeschwindigkeit geprüft. Optimalerweise lag die Tropfgeschwindigkeit bei etwa einem Tropfen pro Sekunde.

Die Reinigung selbst fand auf Grund der räumlichen Gegebenheiten bei Raumtemperatur statt. Dafür wurde zunächst der Vollextrakt nach dem Zellaufschluss (siehe 3.3.2.1) ein- bis dreimal über die Säule gegeben. Die Anzahl der Probenläufe richtete sich nach dem Tropfverhalten der Nickelaффinitätschromatographiesäule. Bei einem hohen Proteingehalt des Vollextraktes verringerte sich die Tropfgeschwindigkeit sehr schnell. Um zu vermeiden, dass das gewünschte Protein im Vollextrakt übermäßig lang im Probenreservoir über der Säule der umgebenden Raumtemperatur ausgesetzt wurde, wurde die Anzahl der Probenläufe von drei auf zwei oder eins vermindert. Restprotein, welches nach dem ersten Probenlauf noch im Durchlauf vorhanden war, konnte in einer zweiten Reinigung zu späterem Zeitpunkt gewonnen werden.

Nachdem die Probenläufe abgeschlossen waren, wurde die Säule mehrmals gewaschen. Zunächst wurden unspezifisch an die Säule gebundene Proteine durch die Zugabe von 10 ml 1x PBS von der Säule entfernt. Die folgenden Waschschriffe enthielten, zur Entfernung von leicht assoziierten Proteinen, Imidazol. Für den zweiten Waschschriff wurden 2 ml eines Puffers aus 1x PBS mit 150 mM NaCl und 10 mM Imidazol eingesetzt. Abschließend wurde mit 2 ml 1x PBS mit 150 mM NaCl und 20 mM Imidazol gewaschen. Für die anschließende Elution des gewünschten Proteins wurde der Puffer mit der höchsten Imidazolkonzentration (1x PBS, 150 mM NaCl und 350 mM Imidazol) eingesetzt. Das hochkonzentrierte frei vorliegende Imidazol zeigte eine höhere Affinität zu den Ni^{2+} -Ionen der Säule und verdrängte somit das Protein von dieser. Dadurch war es möglich das gewünschte Protein wieder von der Säule zu eluieren. Die Elution fand schrittweise durch die Zugabe von 2 ml Volumina Elutionspuffer statt. Die Eluate wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Ziel der Elution in mehreren Fraktionen war es, Aliquots des gewünschten Proteins mit möglichst hoher Konzentration zu erhalten. In der Regel wurden etwa sechs Eluate gesammelt, was einem Gesamtelutionsvolumen von 12 ml entspricht. Diese Eluate wurden bis zum nächsten Reinigungsschriff, der Dialyse (siehe 3.3.2.3) auf Eis gelagert.

Ebenfalls auf Eis gelagert wurden Aliquots von 500 µl jedes einzelnen Reinigungsschrittes, so von dem Vollextrakt, dem Probendurchlauf und der drei Waschschriffe. Diese Proben waren Grundlage der späteren *Westernblot*-Analyse zur Prüfung der Proteinreinigung (siehe 3.3.5).

3.3.2.3 *Dialyse*

Als Dialyse bezeichnet man das Verfahren, bei welchem man gezielt das chemische Ungleichgewicht einer hochkonzentrierten Probenkomponente im Vergleich zu seiner Umgebung ausnutzt, um dessen Konzentration in der Probe zu verringern oder diese Komponente gänzlich zu entfernen. Im vorliegenden Fall sollte das Imidazol, welches auf Grund der Elution in hoher Konzentration in den Proteinproben vorliegt, entfernt werden. Dafür wurden die Proben in, zuvor mit demineralisiertem Wasser gespülten, Dialyseschläuche überführt und in ein Dialysegefäß mit 1x PBS gegeben. Die Dialyseschläuche stellen eine semipermeable Membran dar, welche in diesem Fall Moleküle größer 27 kDa, zum Beispiel das gereinigte Protein, zurückhalten und Teilchen kleiner 27 kDa den Übergang in den umgebenden Puffer im Dialysegefäß ermöglichen. So konnte sich ein chemisches Gleichgewicht des Imidazols zwischen der Probe im Dialyseschlach und dem Puffer im Dialysegefäß einstellen, was zu einer Verdünnung der Imidazolkonzentration in der Proteinprobe führte. Im Detail wurden alle Eluate dialysiert, wobei pro vier Liter 1x PBS zwei Eluate mit insgesamt 4 ml Volumen und 350 mM

Imidazol dialysiert wurden. Daraus ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 1000, sodass nach der Dialyse eine Imidazolkonzentration von 0,35 mM in der Probe angenommen werden konnte.

Die Dialyse selbst fand bei 6 °C im Kühlraum und über Nacht statt. Anschließend wurden die Proben wieder aus den Dialyseschläuchen entnommen und in frische 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Bis zur folgenden Prüfung der Proteinreinigung wurden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.3.3 SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) [127]

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnten Proteine, unabhängig von der elektrischen Ladung, nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Detergenz SDS, welches sowohl Komponente des Proben- als auch des Laufpuffers war, hat bei dieser Methode die Aufgabe die proteineigene Ladung zu maskieren. Die dadurch generierte negative Gesamtladung des Proteins ermöglichte ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis.

Für die Anwendung dieser Methode bedurfte es Polyacrylamidgele, welche aus einem Sammel- und einem Trenngel bestanden. Als erstes wurde ein 10 - 12 %iges Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 gegossen. Im Detail wurden Acrylamid (Rotiphorese® Gel A) und N,N-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese® Gel B) in entsprechenden Mengen vermischt. Die Polymerisation setzte nach Zugabe von APS und TEMED ein. Auf das Trenngel konnte ein Sammelgel mit niedriger Polyacrylamidkonzentration und einem pH-Wert von 6,8 gegossen werden. Die genaue Zusammensetzung der SDS-Gele ist im Einzelnen in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Zusammensetzung SDS-Gele

Komponenten	Sammelgel	Trenngel	
		10 %	12 %
ddH ₂ O	1,3 ml	2,5 ml	1,6 ml
Rotiphorese® Gel A	0,38 ml	3,3 ml	3,9 ml
Rotiphorese® Gel B	0,15 ml	1,3 ml	1,6 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 ml	-	-
Trenngelpuffer (pH 8,8)	-	2,6 ml	2,6 ml
10 % w/v APS	25 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Das Sammelgel wurde mit einem Kamm versehen. Dadurch wurden nach dem Auspolymerisieren Taschen für die aufzutragenden Proben enthalten. Die Proteinproben, welche mit Hilfe einer SDS-Page aufgetrennt und analysiert werden sollten, mussten für den Auftrag auf ein Gel vorbereitet werden. Dafür wurden die Proben gegebenenfalls mit 1x PBS verdünnt um eine Überladung zu vermeiden und schließlich im Verhältnis (1:1)

mit einem zweifachen Probenpuffer (2x PP) vermischt. Diese Mischungen wurden für 10 min erhitzt. Proben, welche von Beginn an oder durch Dialyse kein Imidazol enthielten, zum Beispiel Proben des Lysats, Durchlaufs und der Eluate, wurden auf 95 °C erhitzt. Imidazolhaltige Proben, wie jene der Waschfraktionen, wurden auf 65 °C erhitzt. Anschließend konnten die Proben auf die Polyacrylamidgele aufgetragen werden, ebenso wie der vorgefärbte Proteinmarker (*PageRuler® Prestained Protein Ladder*, MBI Fermentas, St. Leon). Die Elektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN III-Gelkammern (BioRad, München, Deutschland) bei einer angelegten Spannung von 100 V im einem TrisHCL/TrisGlycerin-Puffer (SDS-Laufpuffer) durchgeführt. Hatten die Proben das Gel passiert, das heißt, die farbige Lauffront hatte das untere Gelende erreicht, wurde die Elektrophorese beendet und die Gele konnten weiteren Analysen wie der Konzentrations- und Reinheitskontrolle oder einer Westernblot-Analyse zugeführt werden.

3.3.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle nach Proteinreinigung

Für die Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung einer Proteinprobe wurde Probenmaterial, welches über eine SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt war, mit Hilfe einer Coomassielösung gefärbt. Dabei wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass sich der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G250 an basische Aminosäureseitenketten anlagert und somit Proteine unspezifisch anfärben kann. Proben eines reinen Proteins zeigten nur eine gefärbte Hauptbande mit dem erwarteten Molekulargewichts in der entsprechenden Laufspur. Für die Konzentrationsabschätzung wurde ein auf dem Polyacrylamid-Gel mitgeführter BSA-Standard genutzt. Dafür wurde bei einer vorangegangenen SDS-PAGE Rinderserumalbumin (BSA) in Mengen von 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg und 6 µg aufgetragen. Je mehr Protein in einer Probe vorhanden war, desto stärker wurde diese durch den Coomassiefarbstoff schließlich angefärbt. Letztlich wurde die Konzentration durch Vergleich der Probenbande mit den Banden des BSA-Standards näherungsweise bestimmt.

3.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für eine verlässlichere Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinen wurde eine photometrische Messung durchgeführt. Dabei wurde die optische Dichte im linearen Messbereich des Photometers (0,1 - 1) bei 280 nm in UVetten der Firma Eppendorf gemessen. Dieser Methode liegt zu Grunde, dass die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen. Als Referenz diente 4 °C kaltes 1x PBS. Die für die Bestimmung notwendigen

Extinktionskoeffizienten der einzelnen rekombinanten Proteine wurden dem Programm „Vector NTI“ (Version 9, Invitrogen) entnommen.

3.3.6 Immundetektion (*Westernblot*) nach Proteinreinigung

3.3.6.1 Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran

Mit Hilfe des „*Semi-dry Blotting*“ Verfahrens war es möglich, Proteine, welche in einer vorangegangenen SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt worden waren, auf eine Nitrozellulose zu transferieren und weiter zu analysieren. Dieses Verfahren fand in einer „Trans-Blot Semi-Dry Transfer“-Apparatur der Firma Biorad statt. Auf die Anode der Apparatur wurden zunächst vier Lagen *Whatman*-Filterpapier gelegt, die in Anodenpuffer (10 % v/v Roti®-Blot A, 20 % v/v Methanol in ddH₂O) getränkt wurden. Darauf wurden die Nitrozellulosemembran sowie das Polyacrylamid-Gel aus der vorgeschalteten SDS-PAGE positioniert. Abschließend wurde der Aufbau mit weiteren vier Lagen *Whatman*-Filterpapier, inkubiert in Katodenpuffer (10 % v/v Roti®-Blot K, 20 % v/v Methanol in ddH₂O), bedeckt und die Apparatur mit der Katode verschlossen. Der Proteintransfer fand bei einer angelegten Spannung von 18 V statt und dauerte in der Regel eine Stunde. Danach konnte die Konstruktion zurückgebaut und die Nitrozellulosemembran in eine Glasküvette überführt werden.

War es gewünscht, den Proteintransfer zu kontrollieren, so wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S für eine Minute gefärbt. Nach mehrmaligen Spülen der Membran mit ddH₂O erschienen die Proteine in Form von roten Banden.

Für weitere Analysen, wie zum Beispiel eine Immundetektion, mussten zunächst unspezifische, freie Proteinbindestellen der Membran abgedeckt werden. Dafür wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler in Blockierungslösung (5 % v/v Blockierungsstammlösung in TBS-T) inkubiert.

3.3.6.2 Immundetektion von Proteinen

Die Methode der Immundetektion, auch *Westernblot* genannt, beruht auf dem Nachweis eines Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Im vorliegenden Beispiel wurden die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten, His-*Tag* tragenden, Proteine mit einem Antikörper (*anti-pentaHis*-IgG) nachgewiesen. Dieser primäre Antikörper wurde wiederum durch einen Sekundärantikörper erkannt. Da der letztere an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, welche bei dem Umsatz der Substrate Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat (BCIP) eine Farbreaktion hervorrief, konnten über eine solche Nachweiskette die gereinigten Proteine spezifisch nachgewiesen

werden. Auf diese Weise sollte das Vorhandensein der Wunschproteine in den einzelnen Fraktionen einer schrittweisen Reinigung kontrolliert werden.

Im Detail wurde ein *Westernblot* wie folgt durchgeführt. Nach Inkubation der Nitrozellulosemembran in Blockierungslösung wurde diese für eine Stunde mit dem murinen *anti-pentaHIS-IgG* als primären Antikörper behandelt. Jener war (1:1'000) verdünnt. Anschließend wurde die Membran in Waschpuffer (1x TBS-T) dreimal für fünf Minuten gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Primärantikörpermoleküle zu entfernen. Danach konnte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgen. Als Sekundärantikörper wurde ein *rabbit anti-mouse-IgG-AP* ebenfalls (1:1'000) verdünnt. Alle Antikörper, welche für die verschiedensten *Westernblot*-Analysen verwendet wurden, wurden stets in Blockierungslösung verdünnt. Weiterhin wurde die Nitrozellulosemembran erneut dreimal mit 1x TBS-T gewaschen und abschließend für fünf Minuten in Alkalischen-Phosphatase-Puffer (AP-Puffer, 100 mM Tris/HCl (pH 9,5), 50 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl) inkubiert. Dadurch sollte ein günstiges Milieu für die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase (AP) geschaffen werden. Für diese Farbreaktion wurden 50 μ l 77 mg/ml NBP und 37,6 μ l 50 mg/ml BCIP in 10 ml AP-Puffer aufgenommen. Diese lichtempfindliche Lösung wurde über die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach wenigen Minuten Inkubation wurden dann die Proteine in Form violetter Banden auf der Membran sichtbar. Mit dem Abstoppen der Reaktion durch ddH₂O war die Immundetektion der Proteine beendet.

3.3.7 Analytische Studien mit Immundetektion von Proteinen

3.3.7.1 Oligomerisationsstudien von La wt und dessen Cysteinmutanten

Um zu analysieren inwieweit die verschiedenen La Proteinvarianten mit ihrer unterschiedlichen Anzahl an Cysteinen in der Lage sind Oligomere zu bilden, wurden diese unter drei verschiedenen Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese und *Westernblot*-Analyse betrachtet. So wurde für jedes Protein drei Proben vorbereitet. Zunächst wurden die La Proteine, so wie sie der Reinigung entstammten, in 2x Ladepuffer ohne reduzierendes Detergenz wie zum Beispiel DTT oder Mercaptoethanol aufgenommen. Für ein zweites Aliquot wurde das Protein zunächst für 10 min bei RT mit 2 mM $Cu(II)SO_4$ in 1x PBS oxidiert und anschließenden ebenfalls in 2x Ladepuffer ohne DTT aufgenommen. Mit dieser Probe konnte die Existenz von Oligomeren nach Oxidation betrachtet werden. Für den dritten zu analysierenden Zustand wurden die Proteine in 2x Ladepuffer mit DTT aufgenommen. Dadurch konnte untersucht werden, wie die einzelnen Proteine unter reduzierenden Bedingungen vorlagen. Für die Analyse von La wt und den drei Cysteinmutanten wurden 2,5 μ g der drei möglichen Zustandsvarianten (unbehandelt nach

Reinigung, oxidiert und reduziert) nebeneinander auf ein SDS-Polyacrylamidgel (mit 10 %-igem Trenngel) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und geblockt, wie in 3.3.6.1 beschrieben. Danach wurden die Membranen mit (1:100) verdünnten Hybridomaüberständen der monoklonalen *anti-La* Antikörper SW5, 7B6 oder 312B für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T Waschpuffer wurden die Membranen mit dem Sekundärantikörper *rabbit anti-mouse-IgG-AP* (1:1'000) inkubiert. Abschließend wurden die Proben wie in 3.3.6.2 beschrieben detektiert.

3.3.7.2 *Dimerisationsstudien von La wt und dessen Cysteinmutanten*

Für die Beurteilung des Dimerisationsvermögens der La Proteine wurden zunächst 0,5 µg der im Rahmen dieser Arbeit generierten LaC Derivate, LaC und LaC_C₂₃₂A_C₂₄₅A, mehrmals nebeneinander auf ein SDS-Gel (mit 12 %-igem Trenngel) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, siehe (3.3.6.1 und 3.3.6.2). Anschließend wurde die Membran in einzelne Segmente, mit je einer LaC und einer LaC_C₂₃₂A_C₂₄₅A Spur, mit Hilfe eines Skalpells getrennt. Nach Inkubation der Membransegmente in Blockierungslösung wurde zu diesen jeweils eines der La Volllängeproteine für eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben. Die La Volllängeproteine lagen dafür in 1x PBS verdünnt auf eine Endkonzentration mit 0,1 µg/ml vor. Anschließend wurden die nicht gebundenen La Proteine mit TBS-T gewaschen und die Proteinbanden mit SW5 (1:100) und *rabbit anti-mouse-IgG-AP* (1:1'000) und der Substratlösung NBT/BCIP nachgewiesen.

3.3.7.3 *Analyse von RNS-Bindung durch La wt und dessen Cysteinmutanten*

Um zu analysieren ob die rekombinanten La Proteine in der Lage sind, Ribonukleinsäuren zu binden, wurde 0,25 µg La Protein pro Spur verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden diese blockiert und in Membransegmente mit dem Skalpell getrennt. Dabei sollte letztlich auf jedem Segment jede La Proteinvariante einmal vorliegen. Nach Transfer der Membranenteile in separate Glasküvetten wurden diese entweder für 10 min bei RT mit 0,5 % H₂O₂ in 1x PBS oxidiert oder mit 50 mM DTT in 1x PBS reduziert. Anschließend wurden die Membranen einmal mit ddH₂O gewaschen, bevor biotinylierte RNS-Oligomere dazugegeben wurden. Einzelsträngige RNS wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, verdünnt in ddH₂O, verwendet. Für die Inkubation mit dsRNS wurde die biotinylierte

ssRNS (5'-CCAGUAACCAGUCCCUAUAGUGAGUCGUAUUA-3'-Biotin) mit ihrem entsprechenden komplementären nicht markierten ssRNS-Strang (5'-UAAUACGACUCACU-AUAGGGACUGGUUACUGG-3') für 5 min bei 95 °C im Verhältnis (1:1) inkubiert. Dadurch wurde die Bildung des Doppelstrangs gewährleistet. Die dsRNS wurden ebenfalls in ddH₂O auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml eingestellt und anschließend für 1 h bei RT zu den membrangebundenen Proteinen gegeben. Detektiert wurden die Proben anschließend mit einem *anti*-Biotin-IgG (1:200), dem Sekundärantikörper *rabbit anti-mouse*-IgG-AP (1:1'000) und der Substratlösung NBT/BCIP.

3.3.7.4 Analyse von DNS-RNS-Hybridbindung an La wt und dessen Cysteinmutanten

Für die Analyse der DNS-RNS-Bindung durch die verschiedenen La Proteine wurden diese, wie bereits in Kapitel 3.3.7.3 angegeben, vorbereitet, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Blockieren der Membranen sowie der Oxidation oder Reduktion der membrangebundenen Proteine (siehe 3.3.7.3) wurden die Membranen einmal mit ddH₂O gewaschen, bevor die Inkubation mit den DNS-RNS-Hybriden erfolgte. Zunächst wurde auch hier eine Variante des *Oligoannealings* durchgeführt. Dafür wurden DIG-markierte ssDNS (5'-TAATACGACTCACTACTATAGGGACTGGTTACTGG-3'-Digoxigenin) mit komplementärer biotinylierter ssRNS (5'-CCAGUAACCAGUCCCUAUAGUGAGUCGUAUUA-3'-Biotin) im Verhältnis (1:1) in ddH₂O aufgenommen. Durch eine Inkubation für 5 min bei 95 °C wurde die Hybridbildung durchgeführt. Anschließend wurde die DNS-RNS-Hybridlösung in ddH₂O auf eine Endkonzentration von 0,2 µg/ml verdünnt und für 1 h zur Inkubation bei RT auf die Membranen gegeben. Detektiert wurden die Proben anschließend mit einem murinen *anti*-DIG-F(ab) (1:300) beziehungsweise einem *anti*-Biotin-IgG (1:200) sowie dem Sekundärantikörper *rabbit anti-mouse*-IgG-AP (1:1'000) und der Substratlösung NBT/BCIP.

3.3.8 ELISA

3.3.8.1 Test der redoxabhängigen Antigenität der rekombinanten La Proteine gegenüber den verschiedenen monoklonalen anti-La Antikörpern (*anti*-La mAK)

Mit Hilfe von ELISA sollte die Antigenität der einzelnen *anti*-La mAK gegen die verschiedenen La Proteinderivate getestet werden. La Proteine wurden dafür in ELISA-Beschichtungspuffer auf eine Endkonzentration von 3 ng/µl verdünnt und in 100 µl dieser

Proteinlösung zum Beschichten der einzelnen Reaktionsgefäße (*wells*) der 96-*well* Mikrotiterplatte von *nunc* (ELISA-Platte) genutzt. Zur Beschichtung wurde die ELISA-Platte über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag wurde die Proteinlösung entnommen und 1 h bei 37 °C mit 200 µl/*well* Blockierungslösung-1 (5 % w/v Magermilchpulver in 1x PBS) inkubiert. Im Anschluss wurden die einzelnen *wells* dreimal mit je 250 µl Waschpuffer (1x PBS mit 0,05 % v/v TWEEN20) gewaschen. Um die redoxspezifische Antigenität der *anti*-La Antikörper gegenüber der La Proteine zu testen, blieb ein Drittel der Proben nach dem Blockieren unbehandelt, das zweite Drittel wurde mit 0,5 % H₂O₂ in 1x PBS für 5 min bei RT oxidiert, während das letzte Probensegment für 5 min bei RT mit 50 mM DTT in 1x PBS reduziert wurde. Anschließend wurden die Hybridomaüberstände der *anti*-La mAK in 1x PBS verdünnt. Im Detail wurden die folgenden *anti*-La mAK mit den angegebenen Verdünnungen verwendet: SW5 (1:1'000), 5B9 (1:7'000), 7B6 (1:1'000), 312B (1:1'000) und 2F9 (1:7'000). Die Antikörper lagen dabei für den Versuch im Sättigungsbereich vor. Nach 1 h Inkubation und Entfernen der verdünnten Antikörperlösung wurden die Proben dreimal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen und der (1:2'000) verdünnte Sekundärantikörper *goat anti-mouse*-IgG-HRP für 1 h bei 4 °C dazugegeben. Nach abschließenden dreimaligem Waschen mit 250 µl Waschpuffer, wurden 100 µl pro *well* Substratlösung (10 ml Citrat-Phosphat-Puffer mit einer gelösten TMB-Tablette und 2,5 µl 30 % H₂O₂) hinzugefügt und die Reaktion, inklusive Farbumschlag von farblos nach blau, nach drei Minuten Inkubation durch die Zugabe von 50 µl pro *well* 1 M H₂SO₄ gestoppt. Durch die Zugabe der Schwefelsäure erfolgte ein weiterer Farbumschlag von blau nach gelb. Die optische Dichte wurde anschließend mittels TECAN ELISA-Plattenleser und dem dazugehörigen Programm „Magellan“ (Version 6.6, Tecan, Männedorf, Schweiz) ermittelt. Die Datenauswertung erfolgte mit „Microsoft Excel 2007“ (Version 12.0, Microsoft Corporation), die grafische Aufarbeitung der Daten mit „GraphPadPrism®“ (Version 5.01, GraphPad Software Inc.).

3.3.8.2 Bindungskurven der monoklonalen *anti*-La Antikörper gegenüber La wt und La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A

Im Rahmen der Analysen zur redoxabhängigen Antigenität von La gegenüber den einzelnen *anti*-La mAK wurden Bindungskurven mit ELISA bestimmt und anschließend die einzelnen K_D-Werte berechnet. Die Beschichtung von 96-*well* Mikrotiterplatten erfolgte mit 3 ng/µl La wt beziehungsweise La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A in ELISA-Beschichtungspuffer bei 4 °C über Nacht. Nach dem anschließenden Blockieren für 1 h bei 37 °C mit 5% m/v Magermilchpulver in 1x PBS wurden die Proben dreimal mit Waschpuffer (1x PBS mit 0,05 % v/v TWEEN20) gespült und anschließend für 5 min bei RT mit 0,5 % v/v H₂O₂ inkubiert. Das La wt Protein wurde dadurch oxidiert, während die Cysteinmutante von

diesem Schritt unbeeinflusst blieb. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe der *anti*-La Antikörper SW5, 5B9, 7B6 beziehungsweise 312B in folgenden Konzentrationen: 500 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml und 0,1 ng/ml. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurde der Überstand der Proben entfernt und nach drei Waschschriften konnte der Sekundärantikörper *goat anti-mouse*-IgG-HRP für 1 h bei 4 °C dazugegeben werden. Die Probendetektion, -analyse und die Datenauswertung erfolge wie in 3.3.8.1 beschrieben.

3.3.8.3 Analyse des TNF α -Gehalts in Zellkulturüberständen von dendritischen Zellen (slanDCs) mit Hilfe eines TNF α -ELISAs

Nach Aktivierung sezernieren dendritische Zellen große Mengen des Tumornekrosefaktors (TNF α) in deren Kulturüberstand. TNF α kann mittels „OptEIA Human TNF α -ELISA“ Kit (BD Bioscience) nachgewiesen werden und dient als Maß für den Aktivierungsgrad, wie bei Feldmann *et al.* (2012) beschrieben [117]. Im vorliegenden Experiment wurden slanDCs zunächst mit und ohne 5 pmol La wt Protein oder La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A für 20 h bei 37 °C kultiviert, siehe in 3.4.10. Anschließend wurden die Kulturüberstände gesammelt, bevor sie mittels des oben erwähnten *Kits* im ELISA auf ihre TNF α -Konzentration getestet wurden. Für die Analyse der Überstände musste zuvor eine 96-*well* Mikrotiterplatte mit 100 μ l/*well* *Capture*-Antikörper aus dem „OptEIA Human TNF α -ELISA“ *Kit* beschichtet werden. Dafür wurde dieser Antikörper (1:250) in ELISA-Beschichtungspuffer (8,4 g/l NaHCO₃, 3,56g/l Na₂CO₃ in ddH₂O, pH 9,5) verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (1x PBS mit 0,05 % v/v TWEEN20) wurden die freien Bindestellen der *wells* der ELISA-Platte mit ELISA-Blockierungslösung-2 (1x PBS mit 10 % v/v FKS) beschichtet. Anschließend wurde die ELISA-Platte für eine Stunde bei RT inkubiert. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung des TNF α -Standards und der slanDCs-Kulturüberstände. Beide wurden dafür in ELISA-Blockierungslösung-2 verdünnt. Die Verdünnungsstufen für den TNF α -Standard sind der Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: Verdünnungsstufen für den TNF α -Standard.

Verdünnungsstufen	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
TNF α [pg/ml]	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	0
ELISA-Blockierungs- lösung-2	990 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
TNF α -Quelle	10 μ l <i>Kit</i> - Stock	300 μ l S1	300 μ l S2	300 μ l S3	300 μ l S4	300 μ l S5	300 μ l S6	-

Die Kulturüberstände wurden (1:51) verdünnt. Nach Blockieren der freien Bindestellen der ELISA-Platte wurden die einzelnen *well*s dreimal mit Waschpuffer gespült, bevor 100 μ l der verdünnten Proben beziehungsweise des TNF α -Standards aufgetragen wurden. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde jedes *well* fünfmal mit Waschpuffer gespült und mit 100 μ l/*well* Detektionsantikörperlösung des *Kits* für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein siebenfacher Waschzyklus und die Zugabe von 100 μ l/*well* Substratlösung (10 ml Citrat-Phosphat-Puffer mit einer gelösten TMB-Tablette und 2,5 μ l 30% H₂O₂). Abgestoppt wurde die Reaktion nach 30 min Inkubation im Dunkeln mit 50 μ l 1M H₂SO₄. Die Analyse der Daten erfolgte wie in 3.3.8.1 beschrieben. Das heißt, die optische Dichte wurde mittels TECAN ELISA-Plattenleser und dem dazugehörigen Programm „Magellan“ (Version 6.6, Tecan, Männedorf, Schweiz) ermittelt. Die grafische Datenauswertung und die statistische Analyse der Probendreifachbestimmungen erfolgte mit „GraphPadPrism®“ (Version 5.01, GraphPad Software Inc.). Für die statistische Bewertung der ermittelten TNF α -Konzentrationen der einzelnen Proben des einzelnen repräsentativen Spenders wurde eine *OneWay*-ANOVA nach Bonferroni durchgeführt (signifikant: #### $p < 0,001$, # $p < 0,01$; signifikant zu „Negativkontrolle“: *** $p < 0,001$, * $p < 0,01$). Für den Vergleich der TNF α -Konzentrationen der einzelnen Proben nach Mitteln der Messergebnisse für die drei verschiedenen Spender wurde ein t-Test durchgeführt (signifikant: #### $p < 0,001$; signifikant zu „Negativkontrolle“: ** $p < 0,05$, * $p < 0,01$).

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 UV-Spektrenaufnahme von Proteinen

Zur Untersuchung des Nukleinsäuregehalts der generierten La Proteine wurden Doppelbestimmungen von UV-Spektren der einzelnen Proteine durchgeführt. Dafür wurden 500 μ g Protein in 1 ml 1x PBS aufgenommen, in Quarzküvetten überführt und deren Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm mit dem UV-

Spektrophotometer (UV VIS Spektrophotometer SPECORD® PC 200, Jena Analytik AG, Deutschland) und dem Programm „WinSPECT“ (Version 2.6, Jena Analytik AG, Deutschland) aufgezeichnet. Die erhaltenen Messdaten wurden schließlich mit „Microsoft Excel 2007“ (Version 12.0, Microsoft Corporation) ausgewertet und mit „GraphPad Prism®“ (Version 5.01, GraphPad Software Inc.) aufgearbeitet.

3.4.2 CD-Spektrenaufnahme, Sekundärstrukturanalyse und Bestimmung der Schmelztemperatur von Proteinen

Für die Analyse der Sekundärstrukturanteile der generierten La Proteine wurden durch die kooperierende Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Fahmy (Institut Ressourcenökologie, Abteilung Biophysik, Helmholtz Zentrum Dresden Rossendorf) CD-Spektren im Anregungswellenlängenbereich von 200 – 260 nm aufgezeichnet. Dafür wurden die Proteine in 1x PBS gelöst mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml zur Verfügung gestellt. Um potentielle redoxbedingte Umfaltungen der Proteine zu analysieren, wurden CD-Spektren in Gegenwart von 90 µM Cu(II)SO₄ aufgezeichnet. Aus der Analyse der CD-Spektren konnten die prozentualen Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente (α -Helices, β -Stränge, Schleifen und unstrukturierte Sequenzabschnitte) für die La Proteine in Ab- und Anwesenheit von Kupferionen bestimmt werden. Dafür wurde der CDSSTR-Auswertealgorithmus (*modification of variable selection method*) nach Johnson (1986, 1990 und 1999) [128; 129; 129; 130] sowie die Referenzdatenbank 4 für die Proteinanalyse im Wellenlängenbereich von 190 – 260 nm verwendet [131; 132].

Für die Analyse der thermischen Denaturierung, inklusive der Bestimmung der Schmelztemperaturen (T_m) der La Proteine, wurden CD-Spektren (zwischen 210 – 260 nm Anregungswellenlänge) über einen längeren Zeitraum unter stetig ansteigender Temperatur aufgezeichnet und anschließend analysiert. Die Gesamttemperaturspanne lag zwischen 10 – 80 °C. Die schrittweise durchgeführte Temperaturerhöhung betrug von Messpunkt zu Messpunkt 2,5 °C. Auch für diesen Versuch wurden die Proteine in 1x PBS gelöst (0,2 mg/ml) in Ab- und Anwesenheit von 90 µM Cu(II)SO₄ zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Daten und die Bestimmung von T_m erfolgte nach Greenfield 2006 [133].

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung von adhärenter Zellen bzw. Suspensionszellen

Adhärenente Zellen (HEK293T, HeLa, 3T3, A9 Zellen) wurden in DMEM_{Standard} (DMEM-Medium, 10 % v/v FKS, 1 % v/v Penicillin/Streptavidin, 1% v/v NEA, 1 % v/v stabilisiertes

Glutamin) in T75 Greiner-Kulturflaschen für drei bis vier Tage bei 37 °C und 5,5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Hatten die Zellen einen Konfluenzgrad von etwa 75 % bis 80 % erreicht, wurde ihnen das Medium entzogen. Anschließend wurden sie vorsichtig mit 1x PBS gespült und durch Inkubation mit 10 ml 1x PBS / 1 mM EDTA für 5 Minuten bei 37 °C vom Flaschenboden abgelöst. Nach Resuspendieren der Zellen wurden diese in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 5 min bei 20 °C und 399x g (Rotixa 50 RS, Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in einem Milliliter frischem DMEM_{Standard} aufgenommen. Anschließend wurden 50 µl bis 100 µl der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit 15 ml frischem DMEM_{Standard} überführt. Suspensionszellen (Jurkat, Daudi, Radji und YTS Zellen) wurden in RPMI_{Standard} (RPMI-Medium, 10 % v/v FKS, 1 % v/v Penicillin/Streptavidin, 1 % v/v NEA, 1 % v/v stabilisiertes Glutamin, 1 % v/v Pyruvat, 1 % v/v HEPES) in T75 Greiner-Kulturflaschen für drei bis vier Tage bei 37 °C und 5,5 % CO₂ im Brutschrank gehalten. War das Medium verbraucht, erkennbar am pH-Wert abhängigen Farbumschlag des Mediums von rot zu orange, wurden die Zellen resuspendiert und in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 399x g (Rotixa 50 RS, Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml 1x PBS zum Waschen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 1 ml frischem RPMI_{Standard} aufgenommen und 100 µl zur Weiterkultivierung in neue Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium ausgebracht.

3.5.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde (1:10) Verdünnungen der Zellsuspensionen mit 0,5 % v/v Trypanblaulösung verwendet. Trypanblau hat die Eigenschaft tote Zellen anzufärben. So wurden beim Auszählen der vier Großquadranten der Neubauerzählkammer nur die nichtgefärbten Zellen gezählt und in die anschließende Berechnung einbezogen. Die mittlere Zellzahl der vier Großquadranten wurde anschließend mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert. Das Ergebnis ergab die Lebendzellzahl pro Milliliter.

3.5.3 Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen, T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen

Voraussetzung für die Isolation von T-Zelle, Monozyten und dendritischen Zellen war die Gewinnung von peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus Frischblutmonovetten oder Blutkonserven, bereitgestellt durch den Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Dresden.

3.5.3.1 Isolation von PBMCs

Das Blut wurde zunächst in 1x PBS/2 mM EDTA verdünnt. Für die Reinigung von PBMCs über einen Ficollgradienten wurde das verdünnte Blut auf Ficoll aufgeschichtet und für 20 min bei 20 °C und 980x g (Rotixa 50 RS, Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Dadurch entstand ein dreiphasiger Gradient mit den roten Blutbestandteilen in der unteren Phase, dem Ficoll in der mittleren Phase und dem Blutplasma als oberste Phase. Die PBMCs befanden sich an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Blutplasma und konnten von dieser mit einer Pipette abgenommen werden. Die geernteten PBMCs wurden in einem 50 ml Greiner-Röhrchen gesammelt, welches abschließend mit 1x PBS / 2 mM EDTA maximal aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden danach für 10 min bei 4 °C und 365x g zentrifugiert, bevor der Überstand abgenommen und verworfen wurde. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend standen die Zellen für Isolationen der verschiedenen PBMC-Subpopulationen zur Verfügung.

3.5.3.2 Isolation und Kultivierung von T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen

Die Isolation von T-Zellen aus PBMCs erfolgte wie von Feldmann, A. *et al.* 2012 [117] beschrieben mit Hilfe des „panT cell isolations“ *Kits* (BD Biosciense). Monozyten wurden durch positive Selektion über CD11 durch Mitarbeiter von Prof. Dr. Schmitz (Institut für Immunologie, TU Dresden) aus PBMCs gewonnen und zur Verfügung gestellt. Deren Isolation sowie die darauf basierenden Generierung von monozytenabstammenden DCs (moDCs) ist bei Hauptmann *et al.* 2014 beschrieben [124]. Die Isolation von 6-sulfo-LacNAc⁺ dendritischen Zellen, kurz slanDCs, wurde, wie von Wehner *et al.* 2008 [122] beschrieben, durchgeführt.

3.5.4 Zellfärbung mit Lebendfarbstoff eFluor670®

Für die Färbung von Zellen mit dem Lebendfarbstoff eFluor670® (*cell proliferation dye* eFluor670®, eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland) wurden $0,6 - 1 \times 10^7$ Zellen eingesetzt, vor der Färbung in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, zweimal mit 1x PBS gewaschen und abschließend in 500 µl 1x PBS aufgenommen. Gleichzeitig wurde ein 1 µl der eFluor670® Stammlösung in 500 µl 1x PBS verdünnt. Diese Färbelösung wurde dann unter *vortexen* der Zellsuspension zugefügt und für 10 min bei 37 °C abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden 5 ml kaltes DMEM_{pur} (DMEM Medium ohne weitere Zusätze) zugegeben und die Zellen für weitere 5 min abgedunkelt auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 °C und 399x g (Rotixa 50 RS, Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen erneut in 5 ml kaltem DMEM_{pur} aufgenommen und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt noch zweimal wiederholt. Abschließend konnte die Zellzahl bestimmt und die Zellen zur Kultivierung ausgebracht werden. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass eFluor670® gefärbte Zellen stets für 24 h vor dem eigentlichen Versuch normal kultiviert wurden, damit eine zu hohe Intensität des Farbstoffes keine negativen Einflüssen auf eventuelle durchflusszytometrische Messungen hatte.

3.5.5 Generierung stabiler Zelllinien inklusive Subzellklonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine 3T3 Fibroblasten verwendet, welche stabil das Fusionsprotein EGFP-La wt beziehungsweise die Mutante EGFP-La_{C18A}C_{232A}C_{245A} exprimierten. Des Weiteren wurden für die Entwicklung eines potentiellen LPS-Sensorsystems HEK293T hTLR4 Zellen für die stabile Expression von EGFP-La wt transduziert.

3.5.5.1 Generierung von stabilen Zelllinien

Für die Generierung stabiler Zelllinien durch Transduktion war zunächst die Herstellung viruspartikelhaltiger Zellüberstände von Nöten. Dafür wurden als erstes 4×10^6 HEK293T Zellen in 10 cm Zellkulturschalen mit 6 ml DMEM_{Standard} ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5,5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Diese konnten am Folgetag transfiziert werden. Dafür wurden in 1 ml DMEM_{pur} 12 µg p6NST70-EGFP-La wt beziehungsweise p6NST70-EGFP-La_{C18A}C_{232A}C_{245A}, 6 µg pCD/NL-BH und 3 µg pMD-GM verdünnt, sowie 62 µl PEI-Lösung dazugegeben. Das Hilfsplasmid pCD/NL-BH kodiert dabei das für das gruppenspezifische Antigen (Gag) und das virale Proenzym (Pol). Der zweite Hilfsvektor

pMD-GM liefert hingegen die Information für das Hüllprotein (Env). Beide Helferplasmide sind entscheidend für die erfolgreiche Synthese von funktionellen Viruspartikeln. Diese Mischung wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Anlagerung von PEI an die Plasmide zu erlauben. Anschließend wurde die Transfektionslösung für 24 h zu den HEK293T Zellen gegeben. Parallel dazu wurden viermal $0,1 \times 10^6$ Zielzellen (3T3 Zellen beziehungsweise HEK293T hTLR4 Zellen) in 6-well-Zellkulturplatten in 5 ml DMEM_{Standard} ausgesät. Am nächsten Tag wurde der viruspartikelhaltige Zellkulturüberstand der HEK293T Zellen gesammelt und durch frisches 6 ml DMEM_{Standard} ersetzt. Gleichzeitig wurde der Überstand von den Zielzellen abgenommen und mit 3 ml Viruspartikel haltigem Zellkulturüberstand der viruspartikelproduzierenden HEK293T überschichtet. Nach weiteren 8 h und 16 h wurde die Virusernte von HEK293T Zellen und die Transduktion von Zielzellen wiederholt. Der Erfolg der Transduktion wurde durch optische Beobachtung des EGFP-Signals am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Nach insgesamt drei Tagen Kultivierung wurden die Zellen unter Selektionsdruck durch Zugabe von Neomycin weiterkultiviert. Die Neomycinbehandlung wurde dreimal wiederholt, um das Überleben und die Proliferation von Zellen mit p6NST70-EGFP-La wt beziehungsweise p6NST70-EGFP- La_{C18}A_{C232}A_{C245}A Präsenz zu fördern.

3.5.5.2 Subklonierung von Zellen

Für die Generierung einer homogenen Zelllinie wurde eine Subklonierung der 3T3 EGFP-La wt und 3T3 EGFP-La_{C18}A_{C232}A_{C245}A Zellen durchgeführt. Dafür wurden Zellsuspensionen auf 0,75 Zellen pro 100 µl DMEM_{Standard} verdünnt und in eine 96-well-Kultivierungsplatte mit 100 µl pro Kultivierungsvertiefung aufgeteilt. Die Zellen wurden dann über einen Zeitraum von zwei Wochen kultiviert und unter dem Fluoreszenzmikroskop bezüglich ihres EGFP-Signals kontrolliert. Pro gewünschte Zelllinie wurden anschließend je zwei Einzelzellklone ausgewählt, die optisch zu hundert Prozent stark EGFP-positiv erschienen. Diese Zellen wurden dann zunächst in 6-well-Zellkulturplatten und später in Zellkulturflaschen zu höheren Zelldichten herangezogen. Abschließend wurde die Expression der EGFP-La-Fusionsproteine durchflusszytometrisch kontrolliert.

3.5.6 Fluoreszenzmikroskopische Analysen zur Bestimmung der intrazellulären La Proteinlokalisierung

3.5.6.1 Präparationen von Zellen für die Epifluoreszenzanalyse

Für die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des La Protein unter verschiedenen Bedingungen wurden adhärente Zellen (3T3, HEK293T und A9 Zellen) in einer Zelldichte

von $0,5 \times 10^5$ in 200 μl DMEM_{Standard} pro Kammer eines 8-well-chamber-slides ausgesät. Suspensionszellen (Jurkat, Radji, YTS und T-Zellen), sowie moDCs und slanDCs wurden in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ in ihrem entsprechenden RPMI-Medium ausgesät. Die Zellen wurden direkt nach der Aussaat für 5 min bei 20 °C und 300x g abzentrifugiert und anschließend für 24 h bei 37 °C bei 5,5 % CO₂ im Inkubator kultiviert, wodurch ein Anwachsen oder im Falle der Suspensionszellen ein Anheften der Zellen auf dem Objektträger erreicht werden sollte.

Am Folgetag wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 100 μl 1x PBS je Kammer gespült. Dann wurden die Zellen gegebenenfalls für 20 min abgedunkelt bei RT in 100 μl Stimulationslösung je Probe inkubiert. Die für die Induktion von Sauerstoffstress verwendeten Stimuli und deren Konzentrationen sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Stimuli zur Induktion von intrazellulärem Sauerstoffstress.

Stimulus	Verwendete Konzentration in Medium
H ₂ O ₂	160 mM
Cu(II)SO ₄	1 mM
Fe(II)Cl ₂	1 mM
NO-Glutathion	1 mM
LPS	0,05 mM
Resiquimod®	0,2 mM

Nach der Induktion von Sauerstoffstress wurde der Überstand von den Zellen entfernt und diese erneut mit 100 μl pro Kammer 1x PBS gespült, bevor sie mit 100 μl je Probe mit 90 % v/v Methanol überschichtet und zur Fixierung 20 Minuten bei -20 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde das Methanol wieder entfernt und die Zellen durch Zugabe von 100 μl 0,1 % v/v TritonX100 in 1x PBS permeabilisiert. Dafür wurden die Zellen 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen der Permeabilisationslösung wurden die Zellen mit verschiedenen monoklonalen *anti-La* Antikörpern (SW5, 5B9, 7B6 und 312B) gefärbt. Pro Probe wurden 100 μl einer 5 $\mu\text{g/ml}$ Lösung gereinigter Antikörper verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4 °C wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen einmal mit 1x PBS gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für eine Stunde bei 4 °C. Als solcher wurde ein *anti-mouse-IgG-Alexa647* Antikörper (rot erscheinend unter dem Fluoreszenzmikroskop) verwendet. Abgeschlossen wurde die Probenpräparation durch Entfernen des Überstandes von den Zellen, wiederholtes Spülen, Eindeckeln der Zellen mit DAPI-haltigem Medium und Verschließen der Probe mit einem Deckgläschen. Um ein Austrocknen der Zellen und ein Verrutschen des Deckgläschens bei der invertierten Fluoreszenzmikroskopie zu vermeiden, wurde dieses zum Schluss mit klarem Nagellack fixiert.

Die Probenanalyse wurde am Fluoreszenzmikroskop Axiovert M200 unter Verwendung der entsprechenden Software „AxioVision“ (Release 4.8. (06-2010)), beides von Zeiss

(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Bildaufarbeitung erfolgte mit Hilfe des lizenzfreien Programms „GIMP“ (Version 2.8). Die Überlagerungsdarstellungen wurden mit Hilfe der Funktion „Ebenen vereinen“ im additiven Verfahren erstellt. Dafür wurden die verwendeten Einzelaufnahmen je mit einer Deckkraft von 50 % eingesetzt, um eine tatsächliche Erzeugung von Mischönen der einzelnen Ausgangsfarben zu erhalten.

3.5.6.2 Quantifizierungen von Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen

Um zu ermitteln wie hoch der prozentuale Anteil von Zellen ist, welche nicht nur eine nukleäre Lokalisation des La Proteins zeigen, sondern auch eine zytoplasmatische Anreicherung, wurden die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen quantifiziert. Dafür wurden das Programm „BZ Analyzer II“ von *Keyence* (*Keyence Microscope Europe*, München, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe dieses Programms konnte für jede Zelle bestimmt werden, wie viel ihres Zellquerschnitts durch eine DAPI-Kernfärbung blau eingefärbt war (Wert A). Gleichzeitig konnte auch der Flächenanteil bestimmt werden, der durch die *anti-La* Färbung rot erschien (Wert B).

$$\Delta = B - A$$

A = Prozentualer Anteil des Zellquerschnitts mit Zellkernfärbung (DAPI, blau)

B = Prozentualer Anteil des Zellquerschnitts mit *anti-La* Protein Färbung (rot)

Die Differenz (Δ) beider Werte erlaubte letztlich eine Zuordnung jeder Zelle in die Gruppe „La ausschließlich im Zellkern lokalisiert“ beziehungsweise „Zelle mit zytoplasmatischer Anreicherung des La Proteins“.

$\Delta < 10 \%$ „La ausschließlich im Zellkern lokalisiert“

$\Delta > 10 \%$ „Zelle mit zytoplasmatischer Anreicherung des La Proteins“

Anschließend wurde mit Hilfe von „Microsoft Excel 2007“ (Version 12.0, Microsoft Corporation) der prozentuale Anteil aller Zellen pro Probe bestimmt, die eine zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins zeigten. An dieser Stelle ist anzumerken, dass in der Regel pro untersuchte Probe 150 bis 200 Zellen für eine quantitative Probenanalyse ausgewertet wurden. Ausnahmen stellten wenig adhärente oder sehr empfindliche Proben, wie DCs, dar. Für diese Proben waren durchschnittlich nur 50 bis 100 Zellen analysierbar.

Abgeschlossen wurde die Quantifizierung der sauerstoffstressbedingten Lokalisationsänderung des La Proteins durch die grafische Aufarbeitung der Daten mit „GraphPadPrism®“ (Version 5.01, GraphPad Software Inc.).

3.5.7 Durchflusszytometrie mit BD FACS Calibur

Für die Untersuchung zur Bindung des La Proteins auf die Oberfläche von diversen Zellen wurde die Durchflusszytometrie als Testverfahren verwendet. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, Messung und Analyse von Signalen einer einzelnen Zelle zu bestimmen. Dies beruht auf der Emissionsmessung von optischen Signalen wie Streulicht und Fluoreszenzimpulsen, wenn Zellen in einer laminar strömenden Trägerflüssigkeit einzeln einen Laserstrahl passieren. Durch den Vorgang der „hydrodynamischen Fokussierung“ wird nach der Aufnahme der Zellsuspension aus einem Probenröhrchen durch Unterdruck gewährleistet, dass die Zellen das Zentrum der Messküvette einzeln passieren. In diesem Zentrum trifft die einzelne Zelle auf einen fokussierten, monochromatischen Lichtstrahl, welcher durch die physikalischen Eigenschaften der Zelle gestreut wird. Die dabei entstehenden Signale lassen eine qualitative und quantitative Analyse der Zelle zu. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht „*forward scattering*“ (FSC) ist dabei ein Maß für die Zellgröße. Ansteigende FSC-Werte geben eine wachsende Zellgröße wieder. Hingegen gibt das Seitwärtsstreulicht „*side scattering*“ (SSC) Informationen bezüglich Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zelle. Je stärker die Ausprägung der intrazellulären Strukturierung beziehungsweise je größer das Maß der Granularität einer Zelle desto stärker ist das Seitwärtsstreulichtsignal. Gleichzeitig zur Streulichtanalyse kann jede Zelle bezüglich verschiedener Fluoreszenzsignale betrachtet werden. So ist die Verwendung von mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern zur Markierung verschiedenster extrazellulärer oder intrazellulärer Antigene gebräuchlich. Werden Fluoreszenzfarbstoffe wie FITC und PE verwendet, deren Emissionsmaxima nach Anregung durch einen speziellen Laser in unterschiedlichen Wellenbereichen liegen, ist eine gleichzeitige Analyse der markierten Antikörper möglich.

3.5.7.1 La-Bindungskurven auf verschiedenen Zelllinien

Die Analyse der Bindeeigenschaften von La auf die Zelloberfläche diverser Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dafür wurden pro Färbung 3×10^6 Zellen eingesetzt. Zu diesen wurden 10 µl La Proteinlösung gegeben mit Konzentrationen von 0,22 µM über 1,11; 2,22; 5,56; 11,11; 22,22 und 33,33 µM. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und für eine weitere Stunde, diesmal bei 4 °C mit dem *anti-La* Antikörper 5B9

(5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Proben wieder mit 1x PBS gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse-F` (ab)-PE* (1:400) für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen in 200 µl 1x PBS aufgenommen und in FACS-Probenröhrchen überführt. Die Analyse der Messdaten erfolgte mit dem lizenzfreien Programm „Flowing Software“ (Version 2.5.0, entwickelt von Perttu Terho, Universität Turku, Finnland). Die grafische Aufarbeitung und die K_D -Wertbestimmung erfolgte mit „GraphPadPrism®“ (Version 5.01, GraphPad Software Inc.).

3.5.8 La-Bindung auf Empfängerzellen nach Kokultivierung mit lebenden, apoptotischen und nekrotischen La-Donorzellen

Um zu analysieren wie das La Protein auf die Oberfläche von lebenden Zellen gelangen kann, wurden Kokultivierungsversuche mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Dafür wurden murine eFluor670® gefärbte Fibroblasten (A9 Zellen) für eine Stunde bei 37 °C in DMEM_{Standard} mit und ohne unterschiedlichen La Proteinquellen kultiviert. Als Negativkontrolle dienten reine A9 Zellen ohne Zusätze. A9 Zellen inkubiert mit 22 µM humanen rekombinanten La wt dienten als positive Referenz in der anschließenden FACS-Analyse. Parallel sollten humane HeLa Zellen als mögliche Quelle für humanes La Protein dienen. So wurden A9 Zellen zum einen mit lebenden HeLa Zellen, apoptotischen HeLa Zellen beziehungsweise mit nekrotischen HeLa Zellen im Verhältnis (1:1) kokultiviert. Um apoptotische HeLa Zellen für diesen Versuch zur Verfügung zu haben, wurde ein Teil der HeLa Zellen mit 50 Gy radioaktiv bestrahlt. Zum Erhalt von nekrotischen HeLa Zellen wurde ein Teil dieser für 6 h bei 42° inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der einstündigen Kokultivierung, beziehungsweise der einstündigen Dekoration der A9 Zellen mit La wt für die Positivkontrolle wurden die Proben mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 µg/ml SW5, 5B9, 7B6 oder 312B und Inkubation bei 4 °C für eine Stunde wurden die Zellen abermals gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde anschließend der *goat anti-mouse-F` (ab)-PE* (1:400) verwendet.

Nach einer weiteren Stunde bei 4 °C wurden die Proben nochmal mit 1x PBS gewaschen, in 200 µl 1x PBS aufgenommen und in FACS-Probenröhrchen überführt. Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte wie in 3.4.7.1 beschrieben. Die grafische und statistische Datenanalyse erfolgte mit „GraphPadPrism®“ (Version 5.01, GraphPad Software Inc.). In der grafischen Darstellung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen MFI-Werte (rMFI) bestimmt. Darunter ist die im FACS bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität, kurz MFI, der Probe abzüglich des MFIs der Negativkontrolle zu verstehen. Die Negativkontrollen wurden durch gleiche Kokultivierungsansätze jedoch ohne Verwendung eines Primärantikörpers bei der

anschließenden Probenfärbung bestimmt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Proben „A9 allein“, „A9 mit lebenden HeLa“, „A9 mit apoptotischen HeLa“ und „A9 mit nekrotischen HeLa“ zu bestimmen, wurden t-Tests durchgeführt ($p < 0,05$ signifikant mit **, $p < 0,001$ signifikant mit ***). Für die Untersuchung der Probenunterschiede, bezüglich des für die *anti*-La Färbung verwendeten monoklonalen Antikörpers, wurde eine *OneWay*-ANOVA nach Bonferroni durchgeführt ($p < 0,001$ signifikant mit ###).

3.5.9 Aktivierung von dendritischen Zellen durch La Proteine

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Analyse des Einflusses von freiem La Protein auf das Immunsystem. Dafür wurde unter anderem *in vitro* geprüft, ob das La Protein zur Aktivierung professioneller antigenpräsentierender Zellen führt. Hierbei wurden als Vertreter dieser Gruppe slanDCs ausgewählt, welche nach Aktivierung große Mengen von Tumornekrosefaktor (TNF α) in deren Kulturüberstand sezernierten. Grundlage dafür waren unter anderem die Arbeiten von Hänsel *et al.* und Jähnisch *et al.* aus dem Jahr 2013 [134; 135].

Nach Isolation von slanDCs aus den PBMCs von drei verschiedenen Blutspendern wurden die Zellen zunächst in RPMI_{HS} (RPMI Medium mit 10 % v/v Humanserum, 1 % v/v Penicillin/Streptavidin, 1 % v/v Pyruvat, 1 % v/v nichtessentieller Aminosäuren, 1 % v/v stabilisiertes Glutamin) aufgenommen. Die Zellzahl wurde dabei auf 1×10^5 Zellen pro 190 μ l eingestellt, was gleichzeitig der Zellzahl pro Probe entsprach. Anschließend wurden 190 μ l *well* slanDCs-Suspension für das folgende Experiment mit geplanter Dreifachbestimmung pro Probe in eine 96 *well* Mikrotiterrundbodenplatte verteilt. Nach einer Ruhephase von 4 h bei 37 °C wurden 10 μ l Aktivierungszusatz zu den Zellen gegeben und für weitere 20 Stunden inkubiert. Die einzelnen La Protein enthaltenenden Aktivierungszusätze sind in Tabelle 24 aufgelistet. Nach der zwanzigstündigen Inkubation der slanDCs mit den einzelnen Aktivierungszusätzen wurden die Zellen abzentrifugiert, bevor die Zellkulturüberstände gesammelt und auf deren TNF α -Gehalt mittels ELISA geprüft wurden, siehe 3.3.9.3.

In einem zweiten Versuch wurden frisch isolierte slanDCs eines repräsentativen Spenders auf deren TNF α Sekretion untersucht, nachdem das ihnen zugefügte La wt entweder zuvor in SLE Spenderserum und Serum von gesunden Spendern für 1 h bei RT inkubiert wurde. Damit sollte geprüft werden, ob sich Hinweise auf eine verminderte Nukleaseaktivität bei SLE Patienten finden lassen, welche sich in einer zur Kontrollgruppe erhöhten TNF α Sekretion der slanDCs zeigen würde. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Für die Kontrollen „Negativkontrolle“, „LPS-Kontrolle“, „La wt“ und „La wt (-DNS/RNS)“ wurden 10 μ l Aktivierungsansatz, entsprechend der Tabelle 24 zugefügt.

Für die Serumproben wurde La wt in 10 µl Serum aufgenommen und inkubiert. Letztlich lagen die Versuchsseren (1:20) verdünnt in der Probe vor.

Die SLE Seren wurden aus 15 ml Frischblut gewonnen, abgenommen in Heparinröhrchen und zur Verfügung gestellt von Frau PD Dr. med. C. Günther (Klinik für Dermatologie, Carl Gustav Carus Universitätsklinikum Dresden). Die Seren gesunder Spender wurden aus zirka 15 ml Blut, abgenommen in EDTA Frischblutmonovetten, gewonnen. Spender waren Freiwillige des Instituts für Immunologie (Medizinische Fakultät, TU Dresden).

Nach Zugabe der 10 µl Aktivierungszusätze zu den slanDCs, einer Kultivierungsphase von 20 Stunden bei 37 °C und der Ernte der Zellkulturüberstände, folgte die Bestimmung des TNFα-Gehalt mittels ELISA (siehe 3.3.8.3) und die Analyse der Daten.

Tabelle 24: Zusätze für die La Protein bedingte slanDC-Aktivierung.

Probe	10 µl Aktivierungszusatz; La Protein & LPS in 1x PBS	Verwendete Menge in 200 µl Probe
Negativkontrolle	RPMI _{HS}	-
LPS-Kontrolle	LPS	25 ng
La wt	La wt (unbehandelt)	250 ng (Endkonzentration: 25 nM)
La wt (-DNS/RNS)	La wt (nach DNase-/RNaseverdau)	250 ng (Endkonzentration: 25 nM)
La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A (unbehandelt)	250 ng (Endkonzentration: 25 nM)
La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A (-DNS/RNS)	La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A (nach DNase-/RNaseverdau)	250 ng (Endkonzentration: 25 nM)

4. Ergebnisse

4.1 Generierung und Produktion rekombinanter La Proteine

Das La Protein verfügt über drei Cysteine, welche den Redoxzustand des Proteins maßgeblich beeinflussen können. Die Lokalisation dieser im Protein wurde bereits in der Einleitung, in Abbildung 9, dargestellt. Im Folgenden wird beschrieben, wie die verschiedensten rekombinanten Proteine, inklusive Substitution der Cysteine gegen Alanin, erzeugt wurden.

4.1.1 Generierung von vier rekombinanten La Proteinen: La wt und dreier Cysteinmutanten

Für die Generierung der vier verwendeten rekombinanten La Proteine wurde als Ausgangsplasmid pSecTag2B-La wt, welches im Bestand der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bachmann bereits vorhanden war, genutzt. Zunächst sollte der Austausch des N-terminalen Cysteins an Position 18 gegen ein Alanin erfolgen, durch sogenanntes *Oligoannealing*. Dafür wurden vier verschiedene Oligonukleotide verwendet (Tabelle 25).

Tabelle 25: Oligonukleotide zur Erzeugung eines dsDNS-Fragmentes von La zum Austausch des Cysteins an Position 18 in ein Alanin; unterstrichen sind die Nukleotide, die das Alanin an Position 18 codieren

Oligonukleotid	Sequenz
O (f1)	5'-CT AGC TAT TCC GGA ATG GCT GAA AAT GGT GAT AAT GAA AAG ATG GCT GCC CTG GAG GCC AAA ATC <u>GCC</u> CAT CAA ATT GAG T-3'
O (f2)	5'- ATT ATT TTG GCG ACT TCA ATT TGC CAC GGG ACA AGT TTC TAA AGG AAC AGA TAA AAC TGG ATG AAG GCT GG GTA C-3'
O (r1)	5'- ATG <u>GGC</u> GATT TTG GCC TCC AGG GCA GCC ATC TTT TCA TTA TCA CCA TTT TCA GCC ATT CCG GAA TAG-3'
O (r2)	5'- CCA GCC TTC ATC CAG TTT TAT CTG TTC CTT TAG AAA CTT GTC CCG TGG CAA ATT GAA GTC GCC AAA ATA ATA CTC AAT TTG-3'

Das Resultat des *Oligoannealings* war das Zwischenprodukt pSecTag2B-La_{C18}A. Für den Austausch der beiden C-terminalen Cysteine an Position 232 und 245 wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit vorwärts *Primer* (f1) und rückwärts *Primer* (r1) durchgeführt und somit das La-Fragment LaC_{C232}A_{C245}A erzeugt. Die Nukleinsäuresequenzen beider *Primer* sind in Tabelle 26 gezeigt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den Vektor pGEM®-T Easy ligiert. Als Resultat für weitere Klonierungsschritte lag nun das Plasmid pGEM®-T Easy_{LaC_{C232}A_{C245}A} vor.

Tabelle 26: PCR-Primer für die Generierung des LaC_{C232}A_{C245}A Fragmentes; unterstrichen sind die Nukleotide, die die Alanine an Position 232 und 245 codieren

Primer	Sequenz
f1	5'- T CTA GAA GAA AAG ATT GGA <u>GCC</u> TTG CTG AAA TTT TCG GGT GAT TTA GAT GAT CAG ACC <u>GCC</u> AGA-3'
r1	5'- T CGA GCA GCT GCT TTG TTT AGG GAT TCT TGT TGG TCT TCT ATT ATT TTC TTC AGT GCT TCT TTC TCA GC-3'

Das Ausgangskonstrukt pSecTag2B-La wt und das Zwischenergebnis pSecTag2B-La_{C18}A waren Basis für weitere Klonierungsschritte. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xba* I und *Apa* I wurden die C-Termini der La Proteine gegen das LaC_{C232}A_{C245}A Fragment aus pGEM®-T Easy_LaC_{C232}A_{C245}A ausgetauscht. Die erhaltenen Ergebnisse wurden als pSecTag2B-La_{C232}A_{C245}A und pSecTag2B-La_{C18}A_{C234}A_{C245}A bezeichnet. Für die spätere bakterielle Expression der rekombinanten Proteine in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 war es notwendig die La Protein codierenden DNA-Sequenzen aus den pSecTag2B-Plasmiden in den Expressionsvektor pET28a mittels *Nhe* I und *Not* I umzuklonieren. Abschließend wurde der N-terminale His-Tag durch *Nco* I/*Nhe* I-Verdau aus den pET28a-La Protein Plasmiden entfernt, da der pET28a über zwei His-Tags verfügt und ein zweiter die Proteinexpression hätte negativ beeinflussen können. Die dadurch entstandenen Überhänge wurden durch eine PCR aufgefüllt und die Plasmide durch die Gabe von T4-Ligase wieder geschlossen. Die durch diese Klonierungsstrategie erzeugten neuen Plasmide sind zusammenfassend in Tabelle 27 aufgelistet. Die Klonierungsstrategie selbst ist in Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 27: Resultate der Klonierungsexperimente; pET28a-La Plasmide für die bakterielle Expression der rekombinanten La Proteine in *E. coli* BL 21

Expressionsplasmide für rekombinante La Proteine
pET28a- La wt
pET28a- La _{C18} A
pET28a- La _{C232} A _{C245} A
pET28a- La _{C18} A _{C232} A _{C245} A

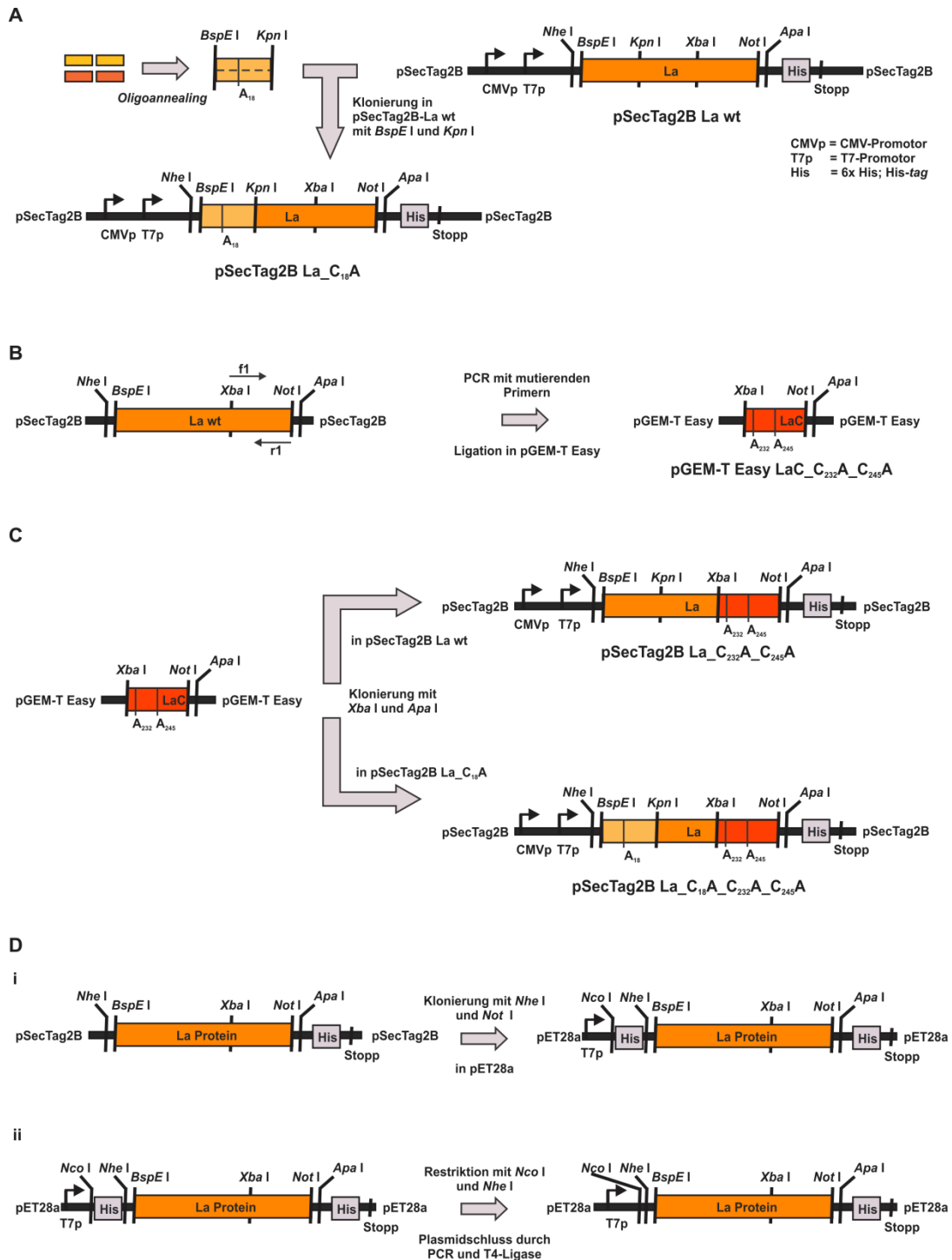


Abbildung 11: Klonierungsstrategie zur Generierung der Cysteinmutanten des La Proteins. (A) Als erstes wurde durch Oligoannealing und *BspEI*/*KpnI* Verdau das N-terminale Cystein in pSecTag2B-La wt durch Alanin substituiert. (B) Durch PCR wurde ein C-terminales Fragment generiert, in welchem die Cysteine an Position 232 und 245 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Das PCR-Produkt wurde in pGEM[®]-T Easy ligiert und war Ausgangsprodukt für die Generierung der La_C₂₃₂A_C₂₄₅A und La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A Konstrukte mittels *XbaI*/*ApaI* Verdau (C). (D) Abschließend erfolgte die Umklonierung der La Protein kodierenden DNS-Sequenzen aus dem Klonierungsvektor pSecTag2B in den Produktionsvektor pET28a mit *NheI*/*NotI* (D i), sowie die Entfernung des potentiell bei der Proteinexpression störenden N-terminalen His-Tags mit *NcoI*/*NheI* (D ii).

Alle generierten rekombinanten La Proteine sind zusammenfassend, schematisch in Abbildung 12 dargestellt. Die skizzenhaften Darstellungen zeigen neben den rot hervorgehobenen Substitutionen gegen Alanin auch den His-Tag (His₆), welcher für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie während der Reinigungsverfahren entscheidend war.

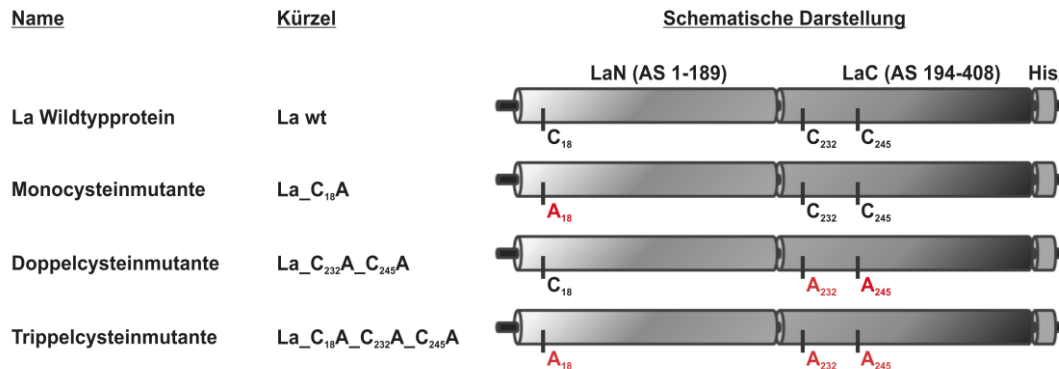


Abbildung 12: Schematische Übersicht der erzeugten und im Folgenden untersuchten rekombinanten La Proteine. Darstellung der rekombinanten La Proteine mit Wildtypprotein und den drei Cysteinmutanten. Alle generierten Proteine verfügen C-terminal über sechs Histidine (His₆), den sogenannten His-Tag. Dieser war Voraussetzung für die affinitätschromatografische Reinigung der Proteine mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure Säulen.

4.1.2 Produktion und Reinigung der La Cysteinmutanten

Die La Proteine sind mit Hilfe von *E. coli* BL21 Kulturen im 800 ml Maßstab produziert worden (siehe 3.3.1.2). Die Reinigung erfolgte wie in 3.3.2 beschrieben mit Hilfe von Ultraschall-Zellaufschluss und Nickelaaffinitätschromatographie. Nach der abschließenden Dialyse wurde der Erfolg der Proteinreinigung mit Hilfe von SDS-gelelektrophoretischer Trennung (siehe 3.3.3) und anschließender *Westernblot*-Analyse (siehe 3.3.6), sowie Reinheitskontrolle durch *Coomassie Brilliant Blue* gefärbter SDS-Gele (siehe 3.3.4) betrachtet.

4.1.2.1 Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmungen

Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Proteinproben der La Proteine nach der Reinigung eventuell noch mit anderen Proteinen verunreinigt waren, erfolgte eine Reinigungskontrolle inklusive Konzentrationsabschätzung. Dafür wurden geringe Mengen der einzelnen Eluatfraktionen (E1) elektrophoretisch über ein SDS-Gel getrennt. Alle Proteine, welche in den einzelnen Eluatfraktionen vorhanden waren und nun im SDS-Gel separiert vorlagen, wurden anschließend mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Die Konzentrationsabschätzung erfolgte über einen mitgeführten BSA-Standard.

Die Abbildung 13 zeigt ein exemplarisches SDS-Gel nach *Coomassie Brilliant Blue* Färbung in Graustufendarstellung. Es sind die Resultate der Reinheitskontrolle für die La Proteine (Laufspuren A bis D) gezeigt. Dabei war zu erkennen, dass alle vier Proben hohe Reinheitsgrade aufwiesen. Dies wurde durch die Dominanz der Monomerbanden bei etwa 50 kDa deutlich. Neben den Monomerbanden waren lediglich nur noch wenige weitere schwachen Banden mit geringerem Molekulargewicht zu erkennen. Sie stimmten hauptsächlich mit den La Fragmenten überein, welche auch in den späteren *Westernblot*-Analysen, in Abbildung 14, dokumentiert wurden. Mit Hilfe der Konzentrationsabschätzungen konnte festgestellt werden, dass sie weniger als 5 % der Proteinmenge in den Eluaten ausmachen und daher vernachlässigt werden konnten.

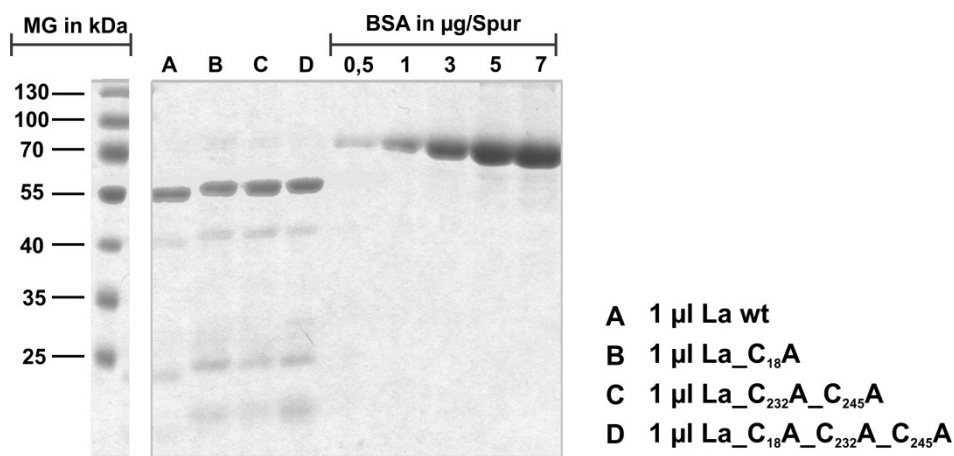


Abbildung 13: Graustufendarstellungen eines Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-Gels zur Beurteilung der Reinheit und Konzentrationsabschätzung der rekombinanten La Proteine. In den Laufspuren A bis D sind die Proteinbanden aus 1 µl Eluatfraktionen der vier rekombinanten Proteine zu sehen. Mit Hilfe des BSA-Standards von 0,5; 1; 3; 5 und 7 µg pro Laufspur konnte auf dem Originalgel in *Coomassie Brilliant Blue* Darstellung die Konzentration näherungsweise bestimmt werden. Die ermittelten Konzentrationen und Proteinausbeuten sind in Tabelle 28 erfasst worden.

Die Proteinmenge und darüber hinaus die Konzentration der La Proteine in den einzelnen Eluatfraktionen wurde mit Hilfe des BSA-Standards ermittelt. Bei dem hier vorliegenden Beispiel wurden folgenden Mengen an BSA auf dem SDS-Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt: 0,5; 1; 3; 5 und 7 µg pro Laufspur. Nach *Einscannen* des Gels, wurde mit Hilfe des Programms „ImageJ“ und des Tools „Analyze – Gels“ die Farbintensität jeder einzelnen Proteinbande bestimmt. Ein Anstieg der Farbintensität korrelierte mit einer steigenden Proteinmenge. Nach Ermittlung der Farbintensitäten für die Banden des BSA-Standards wurde eine Eichgerade mit Hilfe von „Microsoft Excel“ erstellt. Durch diese und die ermittelten Farbintensitäten der Proteinbanden aus den La Protein Eluatfraktionen, konnte die Konzentration der einzelnen La Proteine näherungsweise bestimmt werden. Einen Überblick über die Konzentrationen, der hier

dargestellten exemplarischen Reinigung und die mittlere Ausbeute für die verschiedenen La Reinigungen zeigt die Tabelle 28.

Tabelle 28: Konzentrationen und mittlere Ausbeuten der Reinigungen der verschiedenen La Proteine und La Fragmente

La Protein	Konzentration im Beispiel von Abbildung 13 in [µg/µl]	mittlere Ausbeute der verschiedenen Reinigungschargen aus 800 ml <i>E. coli</i> Kultur
La wt	2,5	20 mg
La_C ₁₈ A	2,5	12 mg
La_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	1,9	10 mg
La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	3,0	15 mg

4.1.2.2 Westernblot-Analysen

Die im Folgenden dargestellten *Westernblots* zeigen die Resultate einer exemplarischen Reinigung der La Proteine, siehe Abbildung 14. Für die Durchführung aller Experimente mit rekombinantem Protein im Rahmen dieser Arbeit waren insgesamt vier Produktions- und Reinigungszyklen notwendig.

In der Abbildung 14 sind die Resultate der La Proteine zu erkennen, wobei der erste Blot das Ergebnis für La wt zeigt, gefolgt von den Blots der La_C₁₈A Mutante, sowie der La_C₂₃₂A_C₂₄₅A und der La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A Mutanten. Für alle vier Varianten des La Proteins war eine starke Proteinbande bei etwa 50 kDa zu erkennen. Diese Bande spiegelte die gewünschten Proteine in Monomerkonformation wieder. Fast alle Fraktionen zeigten außerdem Banden mit geringerem Molekulargewicht. Da diese auch über den His-Tag nachgewiesen wurden, handelte es sich um kleinere Fragmente der La Protein Varianten. Die Banden mit höherem Molekulargewicht repräsentieren Di- und Oligomere von La Proteinen und dessen Fragmenten. Sie waren fast ausschließlich im Lysat [L] und im Durchlauf [D] vorhanden und wurden durch das gewählte Reinigungsverfahren den Proben entzogen. Weiterhin war auffällig, dass bei allen Reinigungen noch große Mengen der gewünschten La Proteine im Durchlauf und in den Waschfraktionen vorhanden waren. Das zeigt, dass die Menge produzierter Proteine die Kapazitäten der für die Reinigung verwendeten Ni-NTA-Affinitätssäulen überschritten hatte. Daher wurden die bei der ersten Reinigung gesammelten Durchläufe meistens ein weiteres Mal über Ni-NTA-Chromatographiesäulen gegeben.

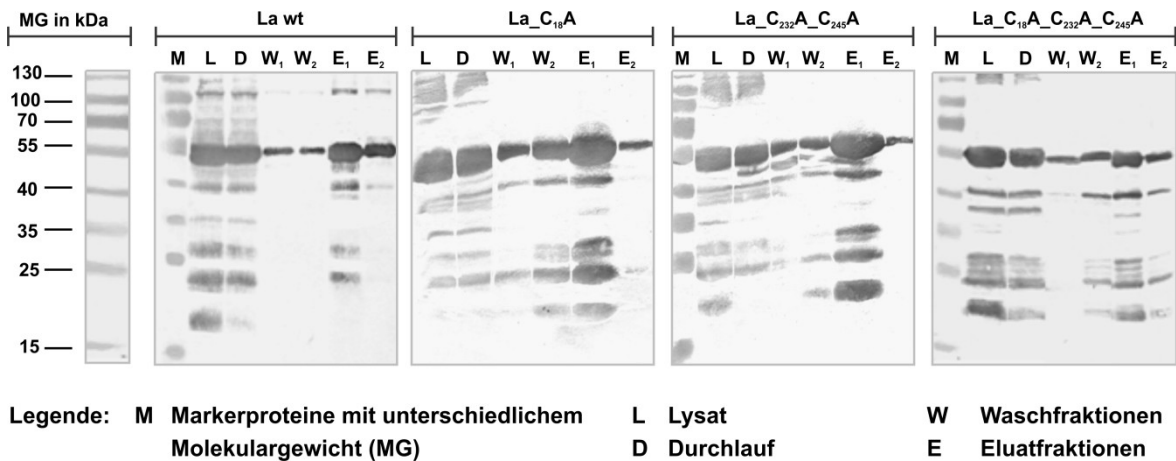


Abbildung 14: Westernblot-Analysen der Reinigung rekombinanter La Protein. Die exemplarischen Darstellungen von *Westernblot*-Analysen nach SDS-Gelelektrophorese zeigen Fraktionen der Proteinreinigung: Lysat der La produzierenden Bakterien [L], Durchlauf nach Auftrag des zu reinigenden Lysats auf die Ni-NTA-Chromatographiesäule [D], Waschfraktionen [W1 - W2] und die Eluate [E1 und E2]. Dargestellt ist das Ergebnis, nachdem 10 µl jeder Reinigungsfraction in SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen wurden. Die Detektion der Proben erfolgte über den His-Tag der rekombinanten Proteine mit einem murinen *anti-pentaHis*-IgG (1:1000) und einem *rabbit anti-mouse*-IgG-AP (1:1000) mit anschließender Farbreaktion nach NBT/BCIP-Inkubation. Für die La Proteine (La wt, La_{C18A}, La_{C232A_C245A} und La_{C18A_C232A_C245A}) sind auf allen *Blots* starke Proteinbanden bei etwa 50 kDa zu erkennen. Diese Banden spiegeln das gewünschte Protein als Monomer wieder.

Auffällig waren darüber hinaus die Banden mit einem Molekulargewicht von weniger als 50 kDa. So wurden nach der Reinigung Proteinfragmente in den Eluatfraktionen gefunden, die etwa 43 kDa, 27 kDa, 23 kDa und zirka 18 kDa groß waren. Ihr Auftreten deckte sich mit den in der Literatur beschriebenen Fragmenten, welche anfänglich bei der Bestimmung des eigentlichen Molekulargewichtes von La für Unstimmigkeiten sorgten [4; 136–139]. Vermutlich gehen die 43 kDa großen Fragmente auf ein alternatives La Produkt zurück, dessen Expression mit dem Methionin an Position 51 beginnt. Dafür sprechen der hier gezeigte Nachweis über den funktionalen C-terminalen His-Tag, sowie der Verlust des Nachweises über dem weit im N-Terminus bindenden *anti-La* mAK 312B, wie es später bei der Erläuterung der Ergebnisse von Abbildung 22 detailliert erklärt wird. Bei den Fragmenten mit einem Molekulargewicht von weniger als 30 kDa handelt es sich um Bruchstücke des C-Terminus, denn sie waren noch über den funktionalen His-Tag nachweisbar. Auch der weit im C-Terminus bindende *anti-La* 7B6 war in der Lage, diese Fragmente zu detektieren, wie die spätere Analyse von Abbildung 22 zeigte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Abbauprodukte der La Proteine, denn bereits in der Literatur wurden viele Proteaseschnittstellen für den C-Terminus beschrieben [4; 138].

4.2 *In vitro* Untersuchung zum Einfluss der Redoxsensitivität auf die Antigenerkennung

Die Dissertation von C. Franke 2009 [109] beinhaltet die ausführliche Erstcharakterisierung verschiedenen *anti*-La mAK. Jener Arbeit ist auch zu entnehmen, dass die *anti*-La mAK der 312B Gruppe nur reduziertes La Protein erkennen (siehe 1.5.4). Darüber hinaus zeigte der *anti*-La mAK 7B6 eine Besonderheit. Dieser erkannte La bei Zellfärbungen nur, wenn diese zuvor oxidativem Stress ausgesetzt waren (siehe 1.5.3). Daher war es von Interesse, die Antigenerkennung von 312B und 7B6 noch genauer zu verifizieren und gegenüber oxidiertem La wt Protein und der permanent reduzierten La Proteinvariante (La_{C18A_C232A_C245A}) zu untersuchen. Zum Vergleich wurden die *anti*-La mAK SW5 und 5B9 mitgeführt.

4.2.1 ELISA-Studien zur redoxsensitiven Antigenerkennung durch *anti*-La mAK

4.2.1.1 *ELISA-Studie zur redoxsensitiven Antigenerkennung von La wt und dessen Cysteinmutanten*

Im folgenden Versuch sollte die Erkennung der Cysteinmutanten im Vergleich zum La wt unter verschiedenen Redoxbedingungen untersucht werden. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dieser Studie dargestellt. Dabei wurden sowohl die nach der Reinigung unbehandelten La Proteine (A), als auch die oxidierten La Proteine (B) und die reduzierten Proteinvarianten (C) mit allen vier *anti*-La mAK untersucht.

Damit die gemessenen optischen Dichten zwischen den einzelnen Proben vergleichbar wurden, wurden die Messwerte normalisiert. Die Resultate, die bei der Detektion mit einem der *anti*-La mAK für die permanent reduziert vorliegende La Variante La_{C18A_C232A_C245A} erzielt wurden, ergaben dabei den Vergleichswert von 100 % (schwarze Balken).

Aus der Grafik (A) wird ersichtlich, dass alle vier *anti*-La mAK die unbehandelten Monocysteinmutanten La_{C18A} (gestreifte Balken), die Doppelcysteinmutante La_{C232A_C245A} (gepunktete Balken) und La wt (graue Balken) gleich gut erkannten, wie die Vergleichsprobe der Tripelcysteinmutante. Lediglich für die Detektion der Doppelcysteinmutante und La wt durch 312B sind kleine Unterschiede im Vergleich zu den anderen beiden La Proteinen zu erkennen, sie waren jedoch nicht signifikant. Dieser Unterschied wurde deutlicher nach Oxidation der La Proteine. In Diagramm (B) ist zu erkennen, dass der 312B die Doppelcysteinmutante und das La Wildtypprotein nach Behandlung mit H₂O₂ wesentlich schlechter erkannte. Die Detektion der Monocysteinmutante war jedoch vergleichbar mit La_{C18A_C232A_C245A}. Die Analysen der

vier La Proteine nach Oxidation durch SW5, 5B9 und 7B6 zeigten keine Unterschiede zueinander, die Antigenerkennung war stets vergleichbar mit der von La_{C18}A_{C232}A_{C245}A. Ähnlich verhielt es sich mit den Resultaten der Analyse der reduzierten Proteine. Auch wenn die Messwerte hier leicht erhöhten Schwankungen unterlagen, was sich in den Standardabweichungen zeigte, waren bei der Analyse der reduzierten La Proteine keine Unterschiede in ihrer Erkennung durch die einzelnen *anti*-La mAK zu verzeichnen, siehe Grafik (C). So lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass in dieser Studie nur der *anti*-La mAK 312B eine redoxabhängige Antigenerkennung zeigte. Der 312B erkennt bevorzugt reduziertes La Protein. Mit diesem Experiment konnten die Ergebnisse von C. Franke 2009 bestätigt werden [109]. Neu ist, dass sich die Redoxsensitivität bei der Antigenerkennung auf das N-terminale Cystein C₁₈ bezieht. Fand ein Austausch gegen Alanin an dieser Position statt, wie bei La_{C18}A und La_{C18}A_{C232}A_{C245}A, konnte das Protein auch nach Oxidation erkannt werden. War jedoch eine Oxidation am C₁₈ möglich, wie im La wt oder der Doppelcysteinmutante La_{C232}A_{C245}A nach H₂O₂ Behandlung, so konnte der 312B sein Antigen nicht mehr erkennen.

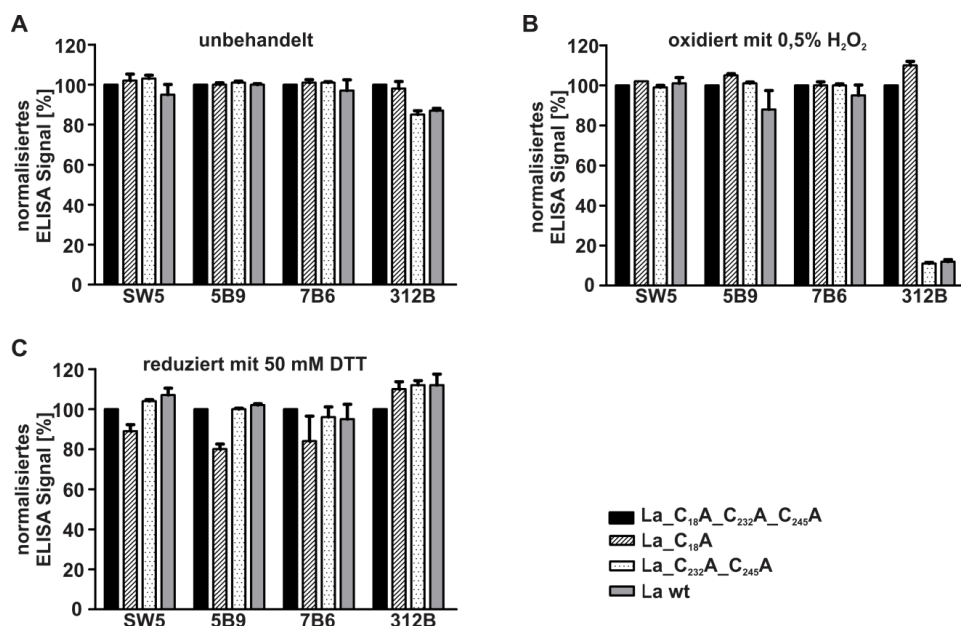


Abbildung 15: ELISA-Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung von SW5, 5B9, 7B6 und 312B. Mikrotiterplatten wurden mit je 3 ng/μl von einem der vier verschiedenen La Proteine beschichtet. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen auf den Platten mit 5 %iger Magermilchpulverlösung blieb ein Drittel der Proben unbehandelt, das zweite Drittel wurde mit 0,5 % H₂O₂ in 1x PBS für 5 min oxidiert, während der dritte Probenanteil für 5 min mit 50 mM DTT in 1x PBS reduziert wurde. Anschließend wurden die La Proteine mit SW5, 5B9, 7B6 und 312B, sowie dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse*-IgG-HRP (1:2000) analysiert. Die gemessenen OD-Werte wurden anschließend normalisiert, wobei die ELISA-Messwerte für La_{C18}A_{C232}A_{C245}A auf 100 % festgelegt wurden, um die ELISA-Signale der anderen La Proteine relativ dazu darzustellen. Die Ergebnisse der unbehandelten Proteine sind in (A), die der oxidierten Proteine in (B) und die der reduzierten La Proteine in (C) dargestellt.

4.2.1.2 ELISA-Studie zur redoxsensitiven Antigenerkennung von LaN und LaN_{C18A} durch anti-La mAK 312B und 2F9

Um zu prüfen, ob diese redoxabhängige Antigenerkennung übertragbar war auf die anderen *anti-La* mAK der 312B Gruppe, wurde eine weitere ELISA-Studie durchgeführt. Dafür wurden zunächst die N-terminalen Fragmente des La Proteins, LaN und LaN_{C18A}, generiert. Die Klonierungsstrategie zur Erzeugung von Produktionsplasmiden dieser Fragmente ist in Abbildung 16 (A) zusammengefasst. In (B) der gleichen Abbildung ist der schematische Aufbau der beiden Konstrukte zu sehen. Die Resultate der erfolgreichen *E. coli* Produktion und Reinigung von LaN und LaN_{C18A} sind in Abbildung 17 dargestellt.

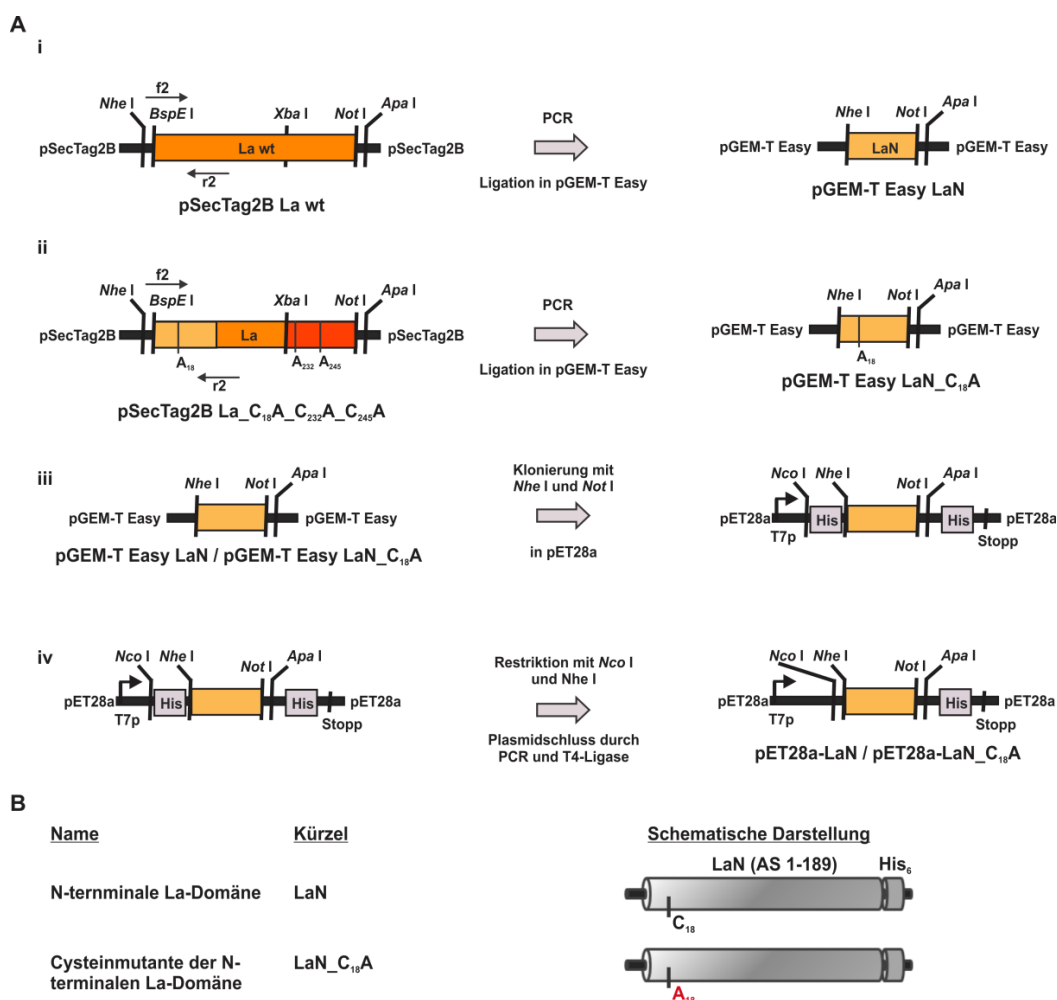


Abbildung 16: Generierung von LaN und LaN_{C18A}. (A) Klonierungsstrategie: Als erstes wurden durch PCR die kodierende DNS-Sequenzen für die N-terminale Domäne des Wildtyp La Proteins amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy ligiert (i). Parallel wurde auf die gleiche Weise die entsprechende Sequenz für die Domänen mit Cysteinsubstitution generiert, mit dem pSecTag2B La_{C18A}C_{232A}C_{245A} Konstrukt als Ausgangsplasmid (ii). Anschließend erfolgte die Umklonierung der DNS-Sequenzen in den Produktionsvektor pET28a mit *NheI*/*NotI* (iii). Abschließend wurde die Entfernung des N-terminalen His-Tags mit *NcoI*/*NheI* durchgeführt, äquivalent zu den DNS-Konstrukten der La Proteine in Abbildung 11 (C) (iv). (B) Schematischer Aufbau der Konstrukte.

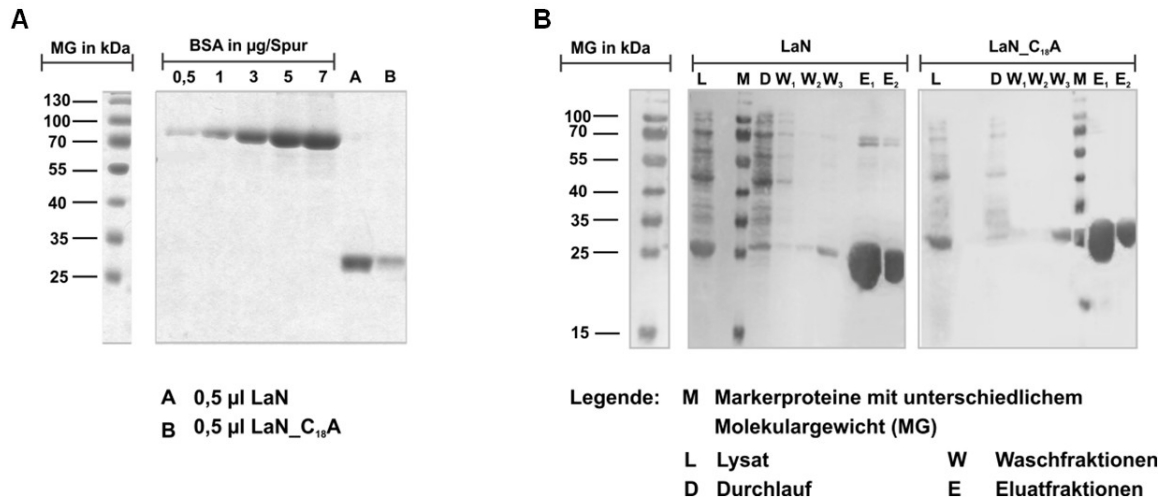


Abbildung 17: Produktion von LaN und LaN_C₁₈A. (A) Graustufendarstellung eines *Coomassie Brilliant Blue* gefärbten SDS-Gels mit BSA-Standard zur Konzentrationsabschätzung und 0,5 µl LaN und LaN_C₁₈A der Reinigungsresultate (Eluat E1). (B) *Westernblot*-Analysen nach SDS-Gelelektrophorese zeigen Fraktionen der Proteinreinigung: Lysat der La produzierenden Bakterien [L], Durchlauf nach Auftrag des zu reinigenden Lysats auf die Ni-NTA-Chromatographiesäule [D], Waschfraktionen [W₁ - W₂] und die Eluate [E₁ und E₂]. Dargestellt ist das Ergebnis nachdem 10 µl jeder Reinigungsfraction in SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen wurden. Die Detektion der Proben erfolgte über den His-Tag der rekombinanten Proteine mit einem murinen *anti-pentaHis-IgG* (1:1000) und einem *rabbit anti-mouse-IgG-AP* (1:1000) mit anschließender Farbreaktion nach NBT/BCIP-Inkubation.

Für die folgende Studie zur Verifizierung der redoxabhängigen Antigenerkennung durch die *anti-La* mAK der 312B Gruppe, wurde als zweiter Vertreter dieser der 2F9 ausgewählt. Als Vergleichsantikörper wurden der SW5 und der 5B9 eingesetzt, siehe Abbildung 18.

Für die Auswertung der Daten wurde wiederum eine Normalisierung auf die nichtoxidierbare Proteinvariante, in diesem Fall LaN_C₁₈A, durchgeführt (schwarzer Balken). Bei der Untersuchung der unbehandelten N-Termini ergab sich, dass die Erkennung von LaN (grauer Balken) im Vergleich zur Mutante LaN_C₁₈A durch die *anti-La* mAK 312B und 2F9 vermindert war, siehe Grafik (A). Wie in Diagramm (B) gezeigt, erkannte der 312B die Wildtypvariante des La N-Terminus' nach Oxidation nur schwach, der 2F9 war gar nicht mehr in der Lage sein Antigen zu detektieren. Eine Reduktion der N-Termini, wie es die Ergebnisse in Grafik (C) zeigen, hatte einen gegenteiligen Effekt. Durch die DTT Behandlung wurde die Erkennung von LaN durch den 312B deutlich verbessert, und vergleichbar mit der Erkennung der Mutante LaN_C₁₈A. Damit bestätigen sich die Resultate aus der vorangegangenen ELISA-Studien. Der 312B erkennt sein Antigen nur, wenn das Cystein an Position 18 reduziert vorliegt.

Auch die Bindung von 2F9 an LaN wurde durch die Reduktion des Proteins verbessert. Es wurde in der ELISA-Studie ein stärkeres positives Signal für diese Proben gemessen, als bei der Analyse unbehandelten LaNs mit dem 2F9. Somit ließ sich die Erkenntnis, welche

bezüglich der redoxabhängigen Antigenerkennung für den 312B gewonnen wurde, auf den 2F9 übertragen.

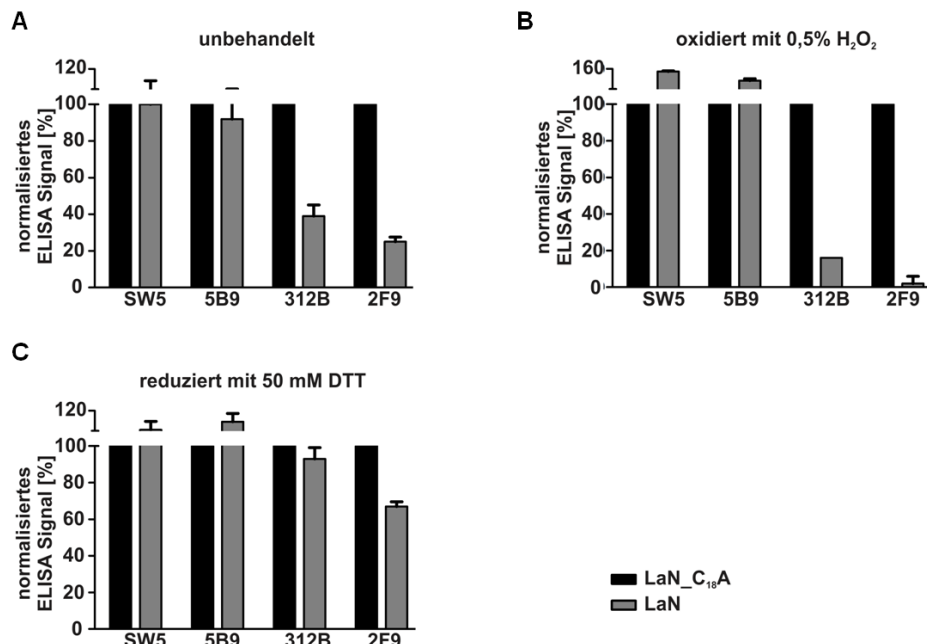


Abbildung 18: ELISA-Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung von 312B und 2F9 im Vergleich zu SW5 und 5B9. Mikrotiterplatten wurden mit je 3 ng/μl LaN beziehungsweise LaN_{C18A} beschichtet. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen auf den Platten mit 5 %iger Magermilchpulverlösung blieb ein Drittel der Proben unbehandelt, das zweite Drittel wurde mit 0,5 % H₂O₂ in 1x PBS für 5 min oxidiert, während der dritte Probenanteil für 5 min mit 50 mM DTT in 1x PBS reduziert wurde. Anschließend wurden die La Proteine mit SW5, 5B9, 312B und 2F9, sowie dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse-IgG*-HRP (1:2000) analysiert. Die gemessenen OD-Werte wurden anschließend normalisiert, wobei die ELISA-Messwerte für LaN_{C18A} auf 100 % festgelegt wurden, um die ELISA-Signale von LaN relativ dazu darzustellen.

4.2.1.3 ELISA-Studie zur K_D -Wertbestimmung von SW5, 5B9, 7B6 und 312B gegenüber La wt und La_{C18A}_{C232A}_{C245A}

In den vorangegangenen ELISA-Studien konnte eindeutig die Redoxabhängigkeit des *anti-La* mAKs 312B gezeigt werden. Nun sollte geprüft werden, ob sich dieses Verhalten auch durch die Bestimmung der Assoziations-/Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) gegenüber dem La wt und der Tripelcysteinmutante belegen lässt. Zum Vergleich wurden auch die K_D -Werte der *anti-La* mAK SW5, 5B9, 7B6 ermittelt. Diese Bestimmung wurde mit Hilfe einer ELISA-Studie durchgeführt, wobei zunächst 3 ng/μl La wt beziehungsweise La_{C18A}_{C232A}_{C245A} genutzt wurden um Mikrotiterplatten zu beschichten. Die so fixierten Antigene wurden zudem mit 0,5 % H₂O₃ oxidiert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Wildtypvariante des La Proteins auch in oxidiert Form vorlag. Die Tripelcysteinmutante La_{C18A}_{C232A}_{C245A} sollte von diesem Behandlungsschritt weitestgehend unbeeinflusst bleiben, da sie keine Cysteine für eine mögliche Oxidation

mit gekoppelter potentieller Umfaltungsreaktion mehr aufweist. Anschließend wurde für die Detektion der La Proteine einer der vier *anti*-La mAK dazugegeben. Für die Erstellung von Bindungskurven wurden die Antikörper in sieben verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: 0,6; 3,3; 6,6; 33; 66; 666 und 3330 pM. Die ermittelten Bindungskurven inklusive der errechneten K_D -Werte sind in Abbildung 19 dargestellt.

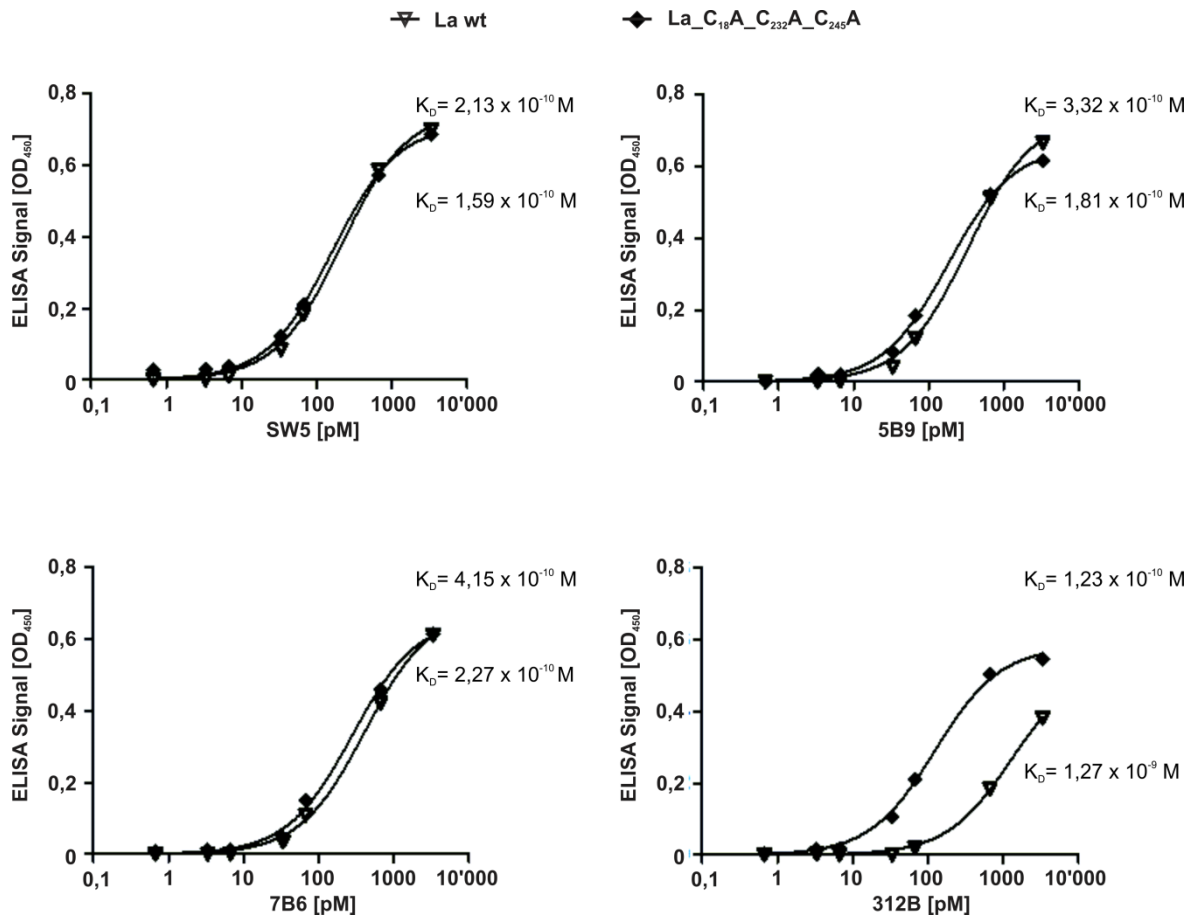


Abbildung 19: ELISA-Studien zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) von SW5, 5B9, 7B6 und 312B gegenüber von oxidiertem La wt und der Cysteinmutante La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A. Für die Bestimmung der K_D -Werte der verschiedenen *anti*-La mAK gegenüber oxidiertem und reduziertem La Protein, wurden Mikrotiterplatten, beschichtet mit 3 ng/ μ l La wt und La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A, zunächst mit 0,5 % H₂O₂ für 5 min oxidiert, bevor die Detektion der Proteine durch die *anti*-La mAK erfolgte. Diese *anti*-La mAK wurden dafür in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,6; 3,3; 6,6; 33; 66; 666 und 3330 pM. Als Sekundäntikörper wurde ein *goat anti-mouse*-IgG-HRP (1:2000) verwendet. Für jeden Messpunkt wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Messung der optischen Dichte (OD₄₅₀, ELISA Signale) jeder Probe, wurde der Mittelwert jedes Messpunktes errechnet. Für die grafische Auswertung wurden die bestimmten ELISA Signale gegen die eingesetzten Antikörperkonzentrationen aufgetragen. Mit Hilfe des Computerprogrammes „GraphPadPrism“ wurden automatisch die Bindungskurven „One Side – Specific Binding“ sowie die K_D -Werte bestimmt.

Aus den Daten war zu entnehmen, dass die Antikörper SW5 (oben links), 5B9 (oben rechts) und 7B6 (unten links), keine Unterschiede in ihren Bindungskurven für das oxidierte La wt und die reduzierte Variante La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A zeigten. Ihre

Assoziations-/Dissoziationskonstanten lagen in einer Größenordnung von 10^{-10} M. Für die Analyse mit dem *anti*-La mAK 312B (unten rechts) ergab sich ein sichtbarer Unterschied zwischen den beiden Bindungskurven. Dabei war die Erkennung der Tripelcysteinmutante La_{C18A_C232A_C245A} vergleichbar mit der Antigenerkennung durch die anderen *anti*-La mAK, was sich auch in dem ermittelten K_D -Wert von $1,23 \times 10^{-10}$ M zeigte. Das Vermögen oxidiertes La Protein zu binden war jedoch herabgesetzt. Dies zeigte sich in der nach rechts verschobenen Bindekurve mit flacherem Anstieg. Der K_D -Wert war um eine zehner Potenz vermindert auf $1,27 \times 10^{-9}$ M. Dies gilt als ein weiterer Beleg dafür, dass der 312B mAK nur reduziertes La Protein erkennt. Dass in diesem Experiment überhaupt eine La wt Detektion durch den 312B mAK möglich war, lag vermutlich an einer unzureichenden Oxidation des Wildtypproteins.

4.2.2 ELISA-Studie zur Analyse der selektiven, redoxabhängigen La Proteinerkennung durch Autoantikörper aus SLE-Patientenseren

Nachdem in Abschnitt 4.2.1 die redoxabhängige Antigenerkennung von *anti*-La mAK untersucht wurde und für den 312B, sowie den 2F9 eindeutig belegt werden konnte, stand nun die Untersuchung von SLE-Patienten Autoantikörpern im Fokus. Dafür wurden 64 Patientenseren hinsichtlich einer präferenziellen Erkennung von oxidiertem oder reduziertem La Protein analysiert. Dies gelang mit Hilfe einer ELISA-Studie, bei der La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A} beschichtete und mit H₂O₂ oxidierte Mikrotiterplatten verwendet wurden, ähnlich wie in den Versuchen in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. So wurde jedes untersuchte SLE-Patientenserum darauf hin getestet, ob es in der Lage ist, oxidiertes La wt oder die permanent reduzierte La Proteinvariante, die Tripelcysteinmutante, zu erkennen. Daraus ergaben sich zwei ELISA-Signale (OD-Werte) für jedes Serum. Aus ihnen wurde die Differenz gebildet, indem das Signal für die Detektion der Mutante von dem der La wt Erkennung abgezogen wurde. Die Seren wurden anschließend sortiert, entsprechend der errechneten Differenz der beiden ELISA-Signale, beginnend mit der größten Differenz. Die daraus entwickelte grafische Darstellung ist in Abbildung 20 zu sehen. Durch die durchgeführte ELISA-Studie konnten die 64 SLE-Patientenseren in zwei Gruppen untergliedert werden. Die Gruppe eins, repräsentiert in Abbildung 20 durch eine positive Differenz der ELISA-Signale, erkannte bevorzugt La wt. Dies ist gleichzusetzen mit einer präferenziellen Erkennung von oxidiertem La Protein. Dem gegenüber stand eine zweite Gruppe von Patientenseren, welche sich durch eine negative Differenz der ELISA-Signale auszeichnete. Diese SLE-Patientenseren erkannten vorzugsweise die Tripelcysteinmutante. Sie beinhalteten demnach Autoantikörper, welche ähnlich den *anti*-La mAK 312B und 2F9, eher reduziertes La Protein erkannten.

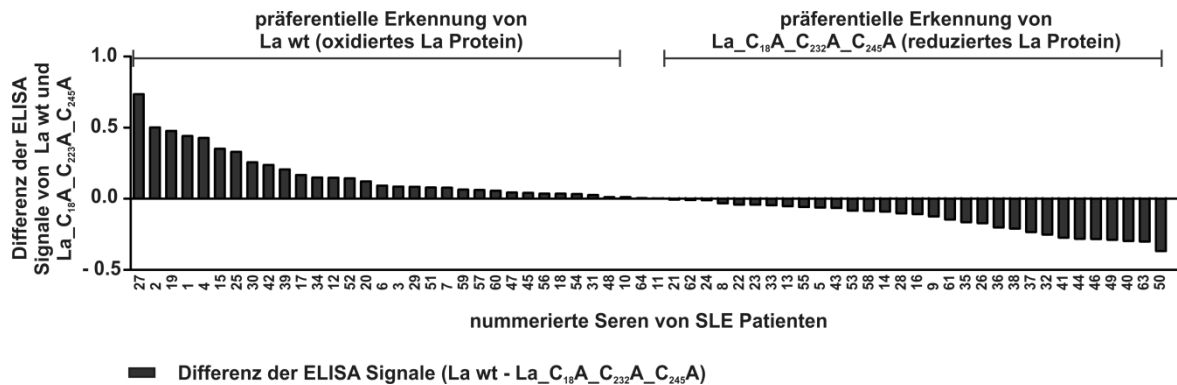


Abbildung 20: ELISA-Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung von Autoantikörpern aus Seren von SLE-Patienten. 64 Seren von SLE-Patienten wurden in einem ELISA-Versuch hinsichtlich der Erkennung von oxidierten und reduzierten La Protein analysiert. Dafür wurden Mikrotiterplatten mit 3 ng/μl La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A} beschichtet. Nach dem Blockieren freier Bindestellen der Mikrotiterplatten mit 5 %iger Magermilchpulverlösung wurden die La Proteine mit 0,5 % H₂O₂ in 1x PBS oxidiert. Anschließend wurden die Seren der SLE-Patienten unverdünnt zugegeben. Abschließend wurden die Proben mit einem *anti*-human-IgG-HRP (1:1000) detektiert. Die Analyse der gemessenen OD-Werte wurde mit „Microsoft Excel“ durchgeführt. Dafür wurde für jedes analysierte Serum die Differenz der OD-Werte (ELISA-Signal) aus der La wt Analyse und der La_{C18A_C232A_C245A} Analyse ermittelt. Die berechneten Differenzen wurden anschließend sortiert, beginnend mit der Größten. Somit war eine Gruppierung der Patientenseren in zwei Gruppen möglich. Gruppe eins zeichnete sich dadurch aus, dass die berechnete Differenz der ELISA-Signale größer null war, was gleichbedeutend mit einer präferentiellen Erkennung oxidierten La Proteins war. Die zweite Gruppe von Patienten Seren zeichnete sich durch eine Differenz der ELISA-Signale kleiner null aus. Diese Seren beinhalten Autoantikörper, die bevorzugt reduziertes La Protein erkannten.

Die Existenz solcher *anti*-La Autoantikörper scheint neu zu sein, da sich in der Literatur bisher keine Hinweise darauf finden ließen. Im Übergangsbereich der beiden ermittelten Gruppen von SLE-Patientenseren fanden sich zudem auch Beispiele, bei denen sich keine oder nur eine geringe Präferenz zu der einen oder anderen Proteinvariante zeigte.

4.2.3 Westernblot-Analysen zur redoxsensitiven Antigenerkennung durch *anti*-La mAK

4.2.3.1 Oligomerisationsverhalten von La wt und dessen Cysteinmutanten und redoxabhängige Antigenerkennung durch anti-La mAK

Schon durch Chan *et al.* 1989 [140] wurde das Molekulargewicht von La mit 46,8 kDa veröffentlicht und laut Pruijn *et al.* 1994 [19] wandert La im SDS-Gel auf einer Höhe von etwa 50 kDa. Doch lange Zeit bestanden Unklarheiten bezüglich des Molekulargewichts des La Proteins. Grund dafür könnten Degradierungen, aber auch die Bildung von Oligomeren sein. Daher sollte mit Hilfe der Cysteinmutanten untersucht werden, inwiefern die einzelnen Cysteine das Oligomerisationsverhalten und damit die Tertiär-, sowie die Quartiärstruktur und die Antigenität des La Proteins beeinflussen. Im Folgenden sind die Resultate dieser Untersuchung erklärt. Es wurde das Oligomerisationsverhalten aller vier

La Proteine unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Zunächst blieben die Proteine nach der Reinigung unbehandelt und wurden als solche über ein SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend über *Westernblot*-Analyse betrachtet. Parallel wurden die Proteine mit Kupfersulfat (Cu(II)SO_4) oxidiert oder mit DTT reduziert, bevor sie gelelektrophoretisch getrennt und im *Westernblot* analysiert wurden. Insgesamt wurde der Versuch dreimal durchgeführt, wobei jeweils ein anderer *anti*-La mAK (SW5, 7B6 oder 312B) für die Analyse verwendet wurde.

In Abbildung 21 sind zunächst die Ergebnisse für die Analyse mit dem SW5 zu sehen. Als erstes soll der rechte *Blot* betrachtet werden. Es wurden hier für die reduzierten Proteine jeweils zwei Banden detektiert. Die dominanten Banden bei etwa 50 kDa spiegeln die Monomere der vier Proteine wieder. Weiterhin war für alle La Varianten das 43 kDa große La Fragment zu erkennen, wobei die entsprechende Bande des La wt Protein (in Laufspur 1) etwas schwächer ausgeprägt war. Dem gegenüber zeigte der *Blot* (links) mit den unbehandelten Proteinen mehr Banden. Neben den bereits beschriebenen Banden, zeigten La wt, die Monocysteinmutante La_{C18A} und die Doppelcysteinmutante La_{C232A_C245A} auch Konformationen mit höherem Molekulargewicht als 50 kDa. Dabei handelte es sich höchst wahrscheinlich um Akkumulationen von mehreren La Molekülen beziehungsweise um Zusammenlagerungen von La und La Fragmenten. Die auffälligste Bande dieser Gruppe, bei etwa 110 kDa, entspricht einem theoretischen La Dimer. Das heißt, nach der Reinigung der verschiedenen La Proteine enthielten drei von ihnen, nämlich La wt, La_{C18A} und La_{C232A_C245A}, neben dem Monomer und kleineren La Fragmenten, Protein in Dimer- oder Oligomerkonformation. Ausnahme war die Tripelcysteinmutante La_{C18A_C232A_C245A}. Diese Variante des La Proteins, welche als permanent reduziert bezeichnet werden kann, bildete keine Di- oder Oligomere. Der mittlere *Blot* zeigt die Ergebnisse des Versuchs nach vorheriger Oxidation der Proteine. Es war auffällig, dass für La wt, La_{C18A} und La_{C232A_C245A} die Signalintensität der 50 kDa Monomerbande abnahm und im Vergleich dazu die Signalintensität der übrigen Banden zunahm. Di- und Oligomerbanden dieser drei La Proteine waren nun deutlicher ausgeprägt. Für La wt wurde eine zusätzliche Bande bei etwa 47 kDa sichtbar. Da diese Bande nur bei unbehandeltem und oxidiertem La wt auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei eventuell um ein Monomer mit interner Cysteinbrücke handeln könnte. Durch eine solche Disulfidbrücke zwischen dem N- und einem der beiden C-terminalen Cysteine käme es zu einer besonders kompakten Monomerkonformation und somit zu einem leicht veränderten Laufverhalten des Proteins. Die drei Cysteinmutanten wiesen dem gegenüber noch eine Bande bei etwa 45 kDa auf, ihr Zustandekommen ist bisher unklar. Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchung war jedoch, dass alle La Proteine, welche über ein Cystein oder mehr Cysteine verfügten, in der Lage waren Di- und

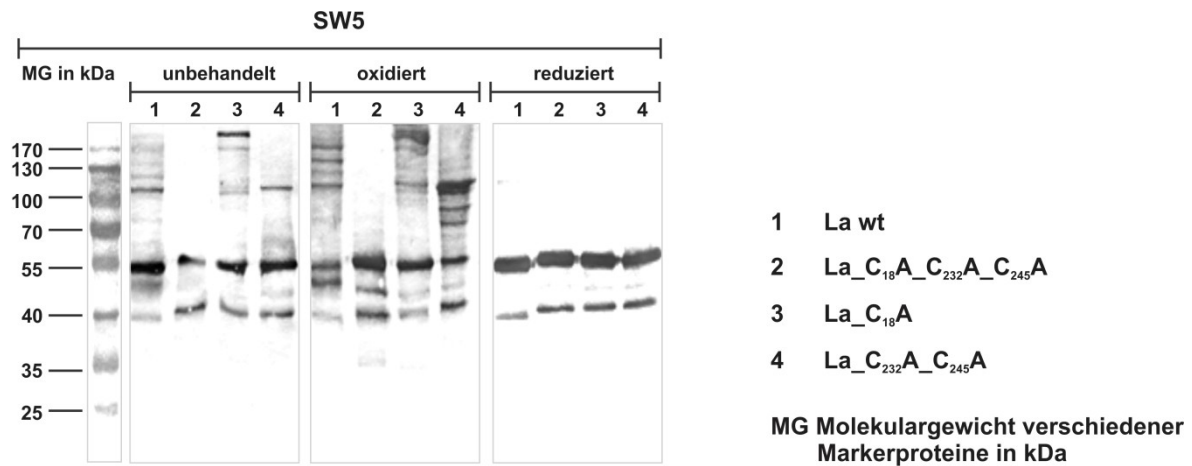


Abbildung 21: Westernblot-Analyse zur Untersuchung des Oligomerisationsverhaltens. Für die Analyse des Oligomerisationsverhaltens von La wt und den drei Cysteinmutanten wurden diese unter drei verschiedenen Zuständen auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zum einen wurde unbehandeltes Protein in 2x Ladepuffer ohne DTT oder Mercaptoethanol aufgetragen. Für den Erhalt oxidierten Proteins wurden die La Volllängeproteine zunächst für fünf Minuten in 1x PBS mit 2 mM Cu(II)SO₄ inkubiert, bevor sie für den Auftrag auf das SDS-Gel in 2x Ladepuffer ohne DTT oder Mercaptoethanol verdünnt wurden. Für die Untersuchung der Proteine unter reduzierenden Bedingungen wurden diese in 2x Ladepuffer mit DTT aufgenommen und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-Gelelektrophorese, dem Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen und dem Blockieren dieser, erfolgte die Detektion der La Volllängeproteine mit den (1:100) verdünnten Hybridomaüberständen mit *anti-La* mAK SW5 und dem Sekundärantikörper *rabbit anti-mouse*-IgG-AP (1:1000).

Oligomere auszubilden. Nur die Tripelcysteinmutante ließ sich, den Erwartungen entsprechend, nicht durch Oxidation in höhermolekulare Konformationen überführen. Für die Verifizierung der redoxabhängigen Antigenerkennung von Di- und Oligomeren durch *anti-La* mAK 7B6 und 312B wurden weitere *Westernblot*-Analysen durchgeführt. Die Resultate dieser Analysen sind in Abbildung 22 dargestellt. In Abbildung 22 (A) sind die Ergebnisse der *Westernblot*-Analyse mit dem 7B6 gezeigt. In diesem Experiment wurde deutlich, dass alle vier La Proteine (La wt, La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A, La_C₁₈A und La_C₂₃₂A_C₂₄₅A) nach Reduktion mit DTT hauptsächlich als 50 kDa großes Monomer vorliegen und durch den 7B6 erkannt werden konnten, siehe rechter *Blot*. Zusätzlich färbte der 7B6 Proteine geringeren Molekulargewichts an, so wie die etwa 43 kDa, 27 kDa und 18 kDa großen La Fragmente aller drei Cysteinmutanten. In der Laufspur des La wt waren Fragmente dieser Größe nur kaum bis gar nicht detektierbar. Bei der Analyse der unbehandelten La Proteine mit Hilfe des 7B6s zeigte sich ein ähnliches Bandenmuster (linker *Blot*). Zusätzlich traten jedoch Banden auf, welche Dimer- und Oligomerkonformationen von La wt, der Monocysteinmutante und der Doppelcysteinmutante entsprachen. Diese Muster deckten sich mit denen aus der Oligomerisationsanalyse mit dem SW5 in Abbildung 21. Der mittlere *Blot* zeigt die

Ergebnisse der Detektion oxidierten La Proteine mit dem 7B6. Auch hier finden sich Übereinstimmungen der Bandenmuster mit der vorangegangenen Oligomerisationsstudie. Der 7B6 war in der Lage, alle vier La Proteine nach Oxidation mit Cu(II)SO₄ zu erkennen. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Banden-Signalintensität der C-terminalen Proteinfragmente zurück ging. Im Falle von La wt, La_C₁₈A und La_C₂₃₂A_C₂₄₅A verschwanden diese Banden fast gänzlich. Das spricht dafür, dass diese C-terminalen Fragmente zu Di- und Oligomeren oxidiert wurden. Da dieser Prozess für die C-terminalen Fragmente der Tripelcysteinmutante, wegen der fehlenden Cysteine nicht möglich war, blieben die entsprechenden Banden erhalten und konnten durch den 7B6 detektiert werden.

Anders verhielt es sich bei den Studien mit dem *anti*-La 312B, wie in Abbildung 22 (B) dargestellt. Die Analyse der reduzierten La Proteine (rechter *Blot*) ergab für jedes der vier La Protein Varianten eine einzige klare Bande mit etwa 50 kDa, was den Monomeren der Proteine entspricht. Die 43 kDa Bande, welche bei den bisherigen Analysen mit SW5 und 7B6 detektiert wurde, war hier nicht nachweisbar. Dies ist ein Indiz dafür, dass der Teil des N-Terminus mit dem 312B-Epitop fehlt oder unvollständig ist. Das gleiche Bandenmuster wie für die reduzierten La Proteine zeigte sich für die unbehandelten La Proteine (linker *Blot*). Hier offenbarte sich nur ein kleiner Unterschied, der die Banden-Signalintensität betraf. So waren für La wt und die Doppelcysteinmutanten schwächere Banden mit dem 312B detektierbar als für die Tripel- und die Monocysteinmutante. Das sprach dafür, dass La wt und La_C₂₃₂A_C₂₄₅A anteilig an ihren C₁₈ reduziert und oxidiert vorlagen und nur der reduziert vorliegende Proteinanteil hier nachgewiesen werden konnte. Deutlicher wurde der Unterschied nach Oxidation mit Cu(II)SO₄, siehe mittlerer *Blot*. Der mAK 312B war nicht in der Lage La wt nachzuweisen, es wurde keine Bande in dieser Laufspur sichtbar. Die Doppelcysteinmutante in Laufspur 4 zeigte nur zwei Banden mit stark verminderter Signalintensität. Eine Bande entsprach der Monomerkonformation, die zweite Bande der Dimerkonformation. Wirklich deutliche Signale wurden für die Tripel- und die Monocysteinmutante detektiert. Dominant traten dabei die Banden der Monomere hervor. Für die Tripelcysteinmutante wurde, wie auch durch die Detektion mit SW5 und 7B6, ein 45 kDa Fragment nachgewiesen. Die Laufspur der Monocysteinmutante zeigte zusätzlich eine Bande mit dem theoretischen Molekulargewicht eines Dimers und eine Bande eines Oligomers. Da die Monocysteinmutante La_C₁₈A noch über beide Cysteine im C-Terminus verfügt, ist sie in der Lage stabile Di- und Oligomere zu bilden. Das gleichzeitige Fehlen des N-terminalen Cysteins an Position 18 ermöglichte die Detektion mit dem *anti*-La mAK 312B. Die Untersuchungen zur redoxabhängigen Antigenerkennung mit Hilfe von ELISA- und *Westernblot*-Studien haben folgendes gezeigt: Sowohl der *anti*-La mAK 312B, als auch der 2F9, erkennen das La Protein nur, wenn das Cystein an

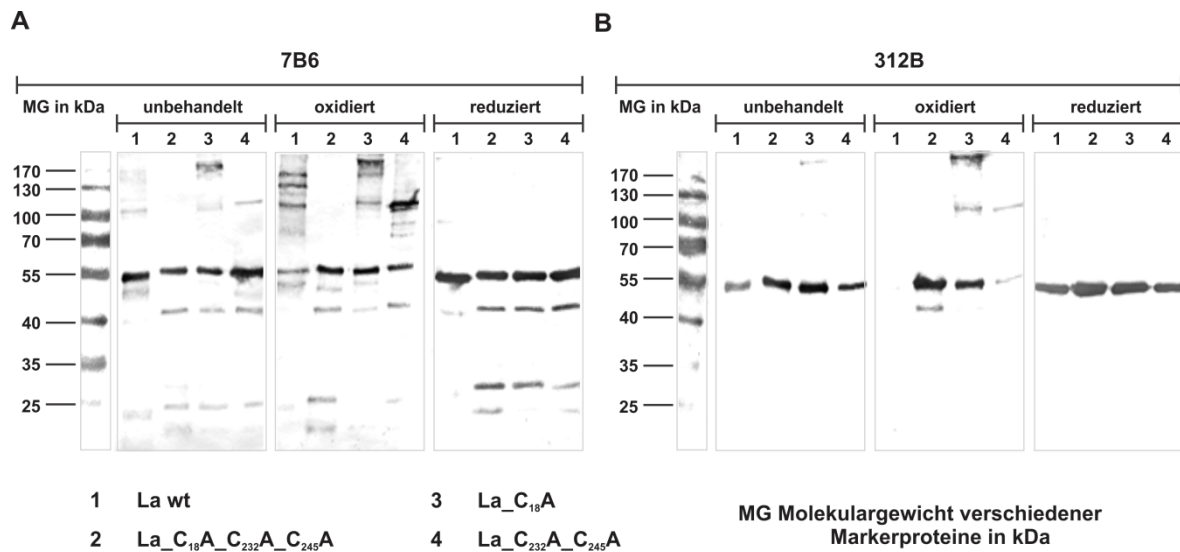


Abbildung 22: Westernblot-Analyse zur Untersuchung des Oligomerisationsverhaltens in Kombination mit der redoxabhängigen Antigenerkennung durch die *anti*-La mAK 7B6 und 312B. Für die Analyse des Oligomerisationsverhaltens von La wt und den drei Cysteinmutanten wurden diese unter drei verschiedenen Zuständen auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zum einen wurde unbehandeltes Protein in 2x Ladepuffer ohne DTT oder Mercaptoethanol aufgetragen. Für den Erhalt oxidierten Proteins wurden die La Volllängeproteine zunächst für fünf Minuten in 1x PBS mit 2 mM Cu(II)SO₄ inkubiert, bevor sie für den Auftrag auf das SDS-Gel in 2x Ladepuffer ohne DTT oder Mercaptoethanol verdünnt wurden. Für die Untersuchung der Proteine unter reduzierenden Bedingungen wurden diese in 2x Ladepuffer mit DTT aufgenommen und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-Gelelektrophorese, dem Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen und dem Blockieren dieser, erfolgte die Detektion der La Proteine mit den (1:100) verdünnten Hybridomaüberständen von drei verschiedenen *anti*-La mAK (7B6 und 312B) und dem Sekundärantikörper *rabbit anti-mouse-IgG*-AP (1:1000). Die Analysen mit dem 7B6 sind in den *Westernblot* unter (A) dargestellt. (B) zeigt die Ergebnisse der Analysen mit dem 312B.

Position 18 reduziert vorliegt oder wie im Falle der Cysteinmutanten gegen Alanin ausgetauscht wurde. Kommt es zur Oxidation an C₁₈ können diese beiden Antikörper ihr Antigen nicht mehr erkennen. Eine Oxidation und der damit verbundenen Di- und Oligomerisation unter artifiziellen Umständen, wie im Fall der Monocysteinmutante La_{C₁₈A}, ermöglicht auch noch eine Detektion dieser Konformer mit dem 312B.

Für den *anti*-La mAk 7B6 konnte im Rahmen dieser Untersuchungen keine Redoxsensitivität bezogen auf seine Antigenerkennung nachgewiesen werden. Auf Grund der Arbeit von C. Franke 2009 [109] wurde zunächst auf eine präferenzielle Erkennung von oxidiertem La Protein geschlossen. Die ELISA- und *Westernblot*-Analysen konnten diese Vermutung nicht stützen. Der *anti*-La mAk 7B6 war in der Lage sowohl oxidiertes als auch reduziertes, rekombinantes La Protein, inklusive aller Cysteinmutanten annähernd gleich gut zu binden.

4.2.3.2 Dimerisationsstudie

Wie anfänglich beschrieben, verfügt das La Wildtypprotein über eine Dimerisationsdomäne im C-Terminus (siehe Abbildung 4, Abschnitt 1.4.2.2). Die Cysteine liegen außerhalb dieses Sequenzabschnittes. Daher war es von Interesse das Dimerisationsverhalten des La Proteins und dessen Cysteinmutanten genauer zu untersuchen. Dafür wurden zunächst die C-terminalen Domänen, LaC und LaC_{C232A_C245A}, generiert und mit Hilfe von *E. coli* produziert. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 23 (A) beschrieben. In (B) dieser Grafik ist der schematische Aufbau der LaC Fragmente dargestellt.

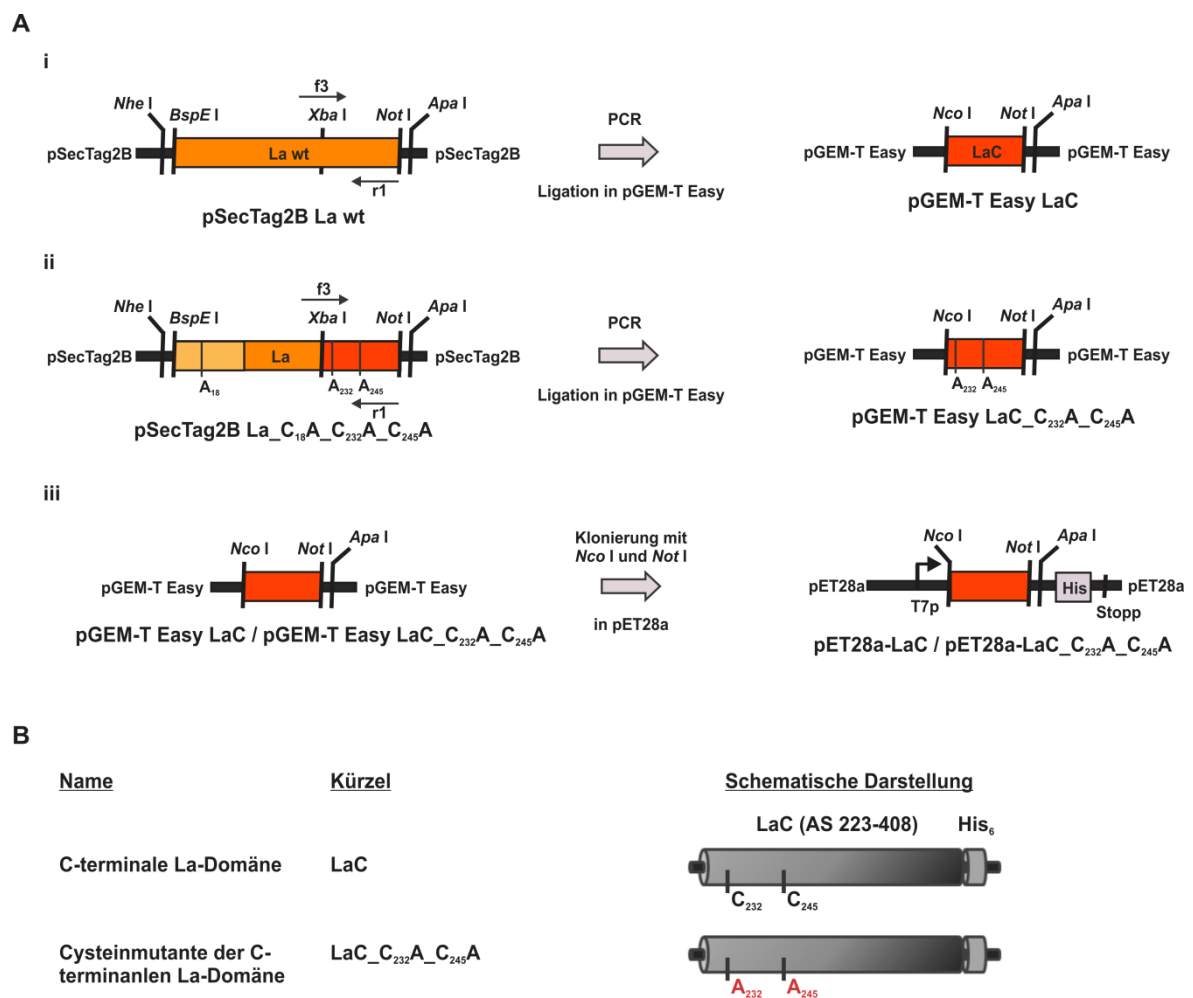


Abbildung 23: Generierung von LaC und LaC_{C232A_C245A}. (A) Klonierungsstrategie: Als erstes wurden durch PCR die kodierende DNS-Sequenzen für die C-terminale Domäne des Wildtyp La Proteins amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM®-T Easy ligiert (i). Parallel wurde auf die gleiche Weise die entsprechende Sequenz für die Domänen mit Cysteinsubstitution generiert, mit dem pSecTag2B La_{C18A_C232A_C245A} Konstrukt als Ausgangsplasmid (ii). Anschließend erfolgte die Umklonierung der DNS-Sequenzen in den Produktionsvektor pET28a mit *NheI*/*NotI* (iii) (B) schematischer Aufbau der Konstrukte.

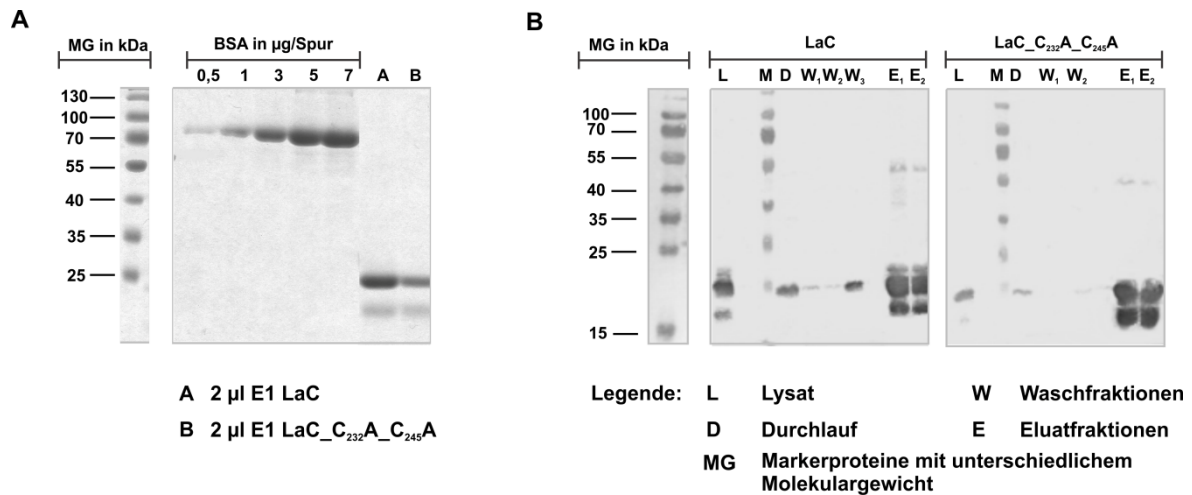


Abbildung 24: Resultate der Produktion und Reinigung von LaC und LaC_C₂₃₂A_C₂₄₅A. (A) Graustufendarstellung eines *Coomassie Brilliant Blue* gefärbten SDS-Gels mit BSA-Standard zur Konzentrationsabschätzung und 0,5 µl LaN und LaN_C₁₈A der Reinigungsergebnisse (Eluat E1). (B) *Westernblot*-Analysen nach SDS-Gelelektrophorese zeigen Fraktionen der Proteinreinigung: Lysat der La produzierenden Bakterien [L], Durchlauf nach Auftrag des zu reinigenden Lysats auf die Ni-NTA-Chromatographiesäule [D], Waschfraktionen [W₁ - W₂] und die Eluate [E₁ und E₂]. Dargestellt ist das Ergebnis nachdem 10 µl jeder Reinigungsfraction in SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen wurden. Die Detektion der Proben erfolgte über den His-Tag der rekombinanten Proteine mit einem murinen *anti-pentaHIS*-IgG (1:1000) und einem *rabbit anti-mouse*-IgG-AP (1:1000) mit anschließender Farbreaktion nach NBT/BCIP-Inkubation.

Die Abbildung 24 (A) und (B) zeigen das Ergebnis der Proteinreinigung, wobei auch hier die Expression zweier LaC-Fragmente (25 kDa und 18 kDa) zu verzeichnen war. Das Prinzip der Dimerisationsstudie soll zunächst mit Hilfe von Abbildung 25 (A) erklärt werden. Schematisch wurde hier dargestellt, dass zunächst die dimerisationsdomänentragenden Fragmente, LaC und LaC_C₂₃₂A_C₂₄₅A, nach SDS-Gelelektrophorese und *semi dry blotting* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe der vier verschiedenen La Proteine, welche wiederum über ihre Dimerisationsdomäne mit jener der membrangebundenen LaC Fragmente interagieren sollten. Der Nachweis der gebundenen La Proteine erfolgte über *anti-La* mAK 5B9, der das La Protein über den N-Terminus erkennt (siehe Abbildung 7, Abschnitt 1.5.2). Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 25 (B) gezeigt. Nebeneinander wurden die vier *Blots* dargestellt, welche das Dimerisationsverhalten der vier verschiedenen La Proteine widerspiegeln. Jeder *Blot* zeigt zwei Banden bei zirka 25 kDa, welche dem Molekulargewicht des *geblotteten* C-terminalen Fragments entsprechen. Die erste Bande repräsentierte ein positives Signal in der Laufspur mit LaC, die zweite Bande zeigte ein äquivalentes Ergebnis für LaC_C₂₃₂A_C₂₄₅A.

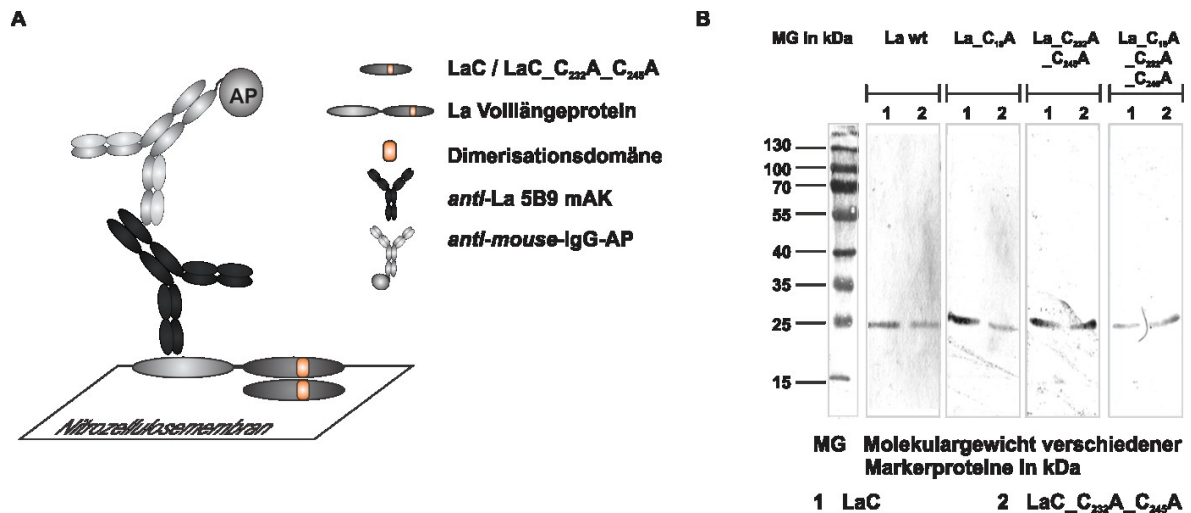


Abbildung 25: Westernblot-Analyse zur Untersuchung des Dimerisationsverhaltens. (A) Schematische Darstellung des Dimerisationsversuches: Für die Analyse des Dimerisationsverhaltens wurden 2,5 µg pro Laufspur der C-terminalen Domäne von La beziehungsweise dessen Cysteinmutante (LaC und LaC_{C232A_C245A}) im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Nach Blockieren und Schneiden der Membran in einzelne Fragmente wurden die einzelnen Membranteile mit je einem La Volllängeprotein für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Volllängeproteine über den N-Terminus des La Proteins mit Hilfe des (1:250) verdünnten Hybridomaüberstands des *anti-La* mAK 5B9. Als Sekundärantikörper wurde ein *rabbit anti-mouse-IgG-AP* (1:1000) verwendet. Die Alkalische Phosphatase (AP), welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, ermöglichte anschließend die Farbreaktion bei der Umsetzung des Substrates NBT/BCIP. (B) Nebeneinander sind die vier einzelnen Membranteile gezeigt, die entweder mit La wt, La_{C18A}, La_{C232A_C245A} oder La_{C18A_C232A_C245A} für die Dimerisation mit der C-terminalen Fragmenten inkubiert wurden. Auf den Westernblotmembranen konnten Banden von circa 25 kDa detektiert werden, was dem Molekulargewicht der C-terminalen La Domäne entspricht.

Die Resultate zeigten, dass alle vier La Proteine, La wt und die drei Mutanten, in der Lage waren, sowohl mit LaC als auch mit der Cysteinmutante der C-terminalen Domäne ein Dimer zu bilden. Da heißt, keines der drei Cysteine des La Proteins war für die Dimerisation zweier La Proteine zwingend notwendig, jedoch für deren Stabilisierung unverzichtbar, wie die Ergebnisse der Oligomerisationsstudie zeigten.

4.2.4 La Proteinerkennung von SW5, 5B9, 7B6 und 312B in intrazellulären Färbungen

Nach der ausführlichen Analyse der redoxabhängigen Antigenerkennung durch *anti-La* mAK SW5, 5B9, 7B6 und 312B in ELISA- und *Westernblot*-Studien mit rekombinanten Proteinen, sollte nun die Analyse bei intrazellulären Färbungen erfolgen.

4.2.4.1 Generierung Fusionsproteine EGFP-La wt und EGFP-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅A}}}

Für die Generierung der EGFP-La Fusionsproteine wurde das EGFP-Fragment mittels der Restriktionsenzyme *Nhe* I und *Bsp*E I aus dem Plasmid pEGFP-c1 herausgeschnitten und in die Plasmide pSecTag2B-La wt und pSecTag2B-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅A}}} ligiert. Diese waren zuvor strangaufwärts der La Protein codierenden DNS-Sequenzen mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffnet wurden. Als Zwischenprodukte lagen nun folgende Plasmide vor: pSecTag2B-EGFP-La wt und pSecTag2B-EGFP-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅A}}}. Für die Erzeugung stabiler Zelllinien, die die gewünschten EGFP-La Fusionsproteine permanent exprimieren, war es notwendig die erhaltenen Konstrukte in den lentiviralen Vektor p6NST70-MCS umzusetzen. Dafür wurden die Vektoren pSecTag2B-EGFP-La wt und pSecTag2B-EGFP-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅A}}} mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nhe*I und *Mss*I und der Zielvektor mit *Xba* I und *Hpa* I geschnitten. Die isolierten EGFP-La Fusionsproteine codierenden dsDNS-Fragmente wurden anschließend in den Zielvektor ligiert, sodass die in Tabelle 29 aufgelisteten Konstrukte entstanden. Die schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 26 gezeigt.

A



B

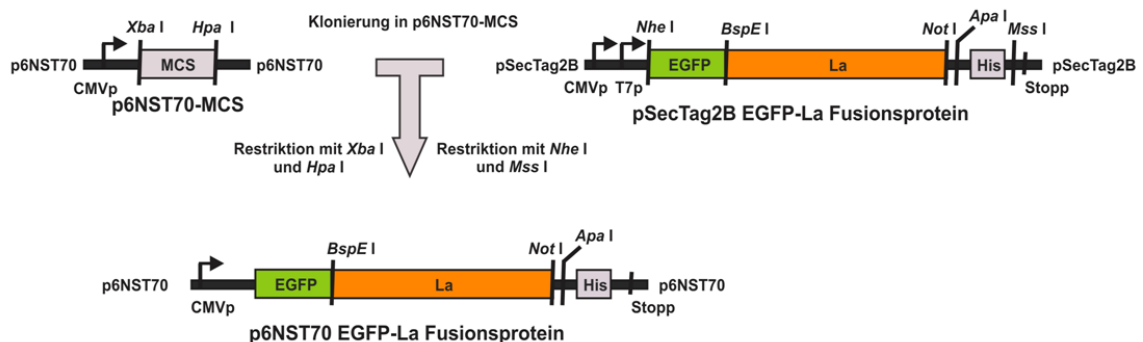


Abbildung 26: Generierung der Fusionsproteine, EGFP-La wt und EGFP-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅A}}} (A) Integration von EGFP mittels *Nhe* I/*Bsp*E I in die pSecTag2B-La Protein Plasmide, wodurch die EGFP kodierende DNS-Sequenz N-terminal von der La Protein kodierenden Sequenz im gleichen Leserahmen platziert wurde. (B) Die entstandenen Zwischenprodukte wurden anschließend in p6NST70-MCS umgesetzt.

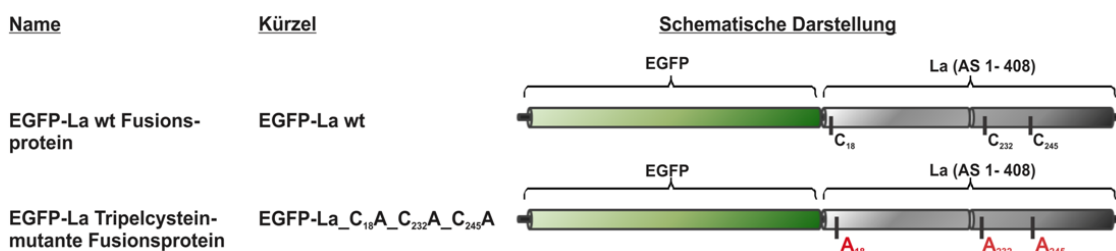
Tabelle 29: Plasmide der EGFP-La Fusionsproteine im lentiviralen Vektor p6NST70 zur Erzeugung stabiler Zelllinien

Lentivirale Vektoren für EGFP-La Fusionsproteine

p6NST70-EGFP-La wt

p6NST70- EGFP-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅}}}

A



B

3T3 Zelllinien mit EGFP-La Fusionsprotein

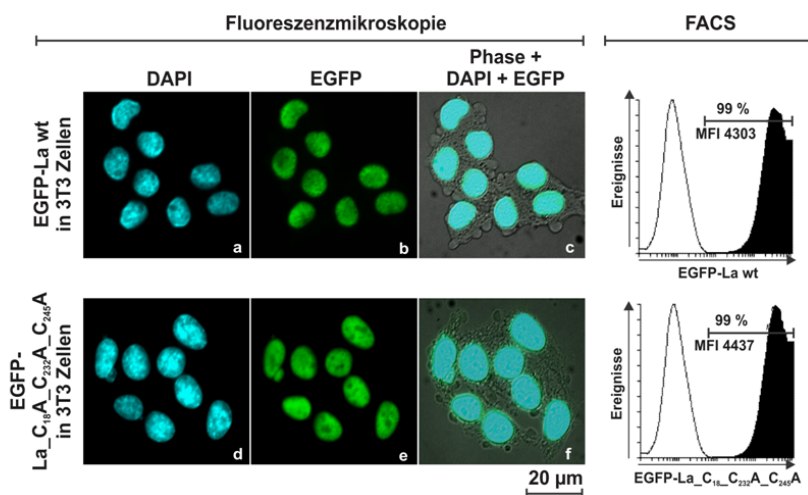


Abbildung 27: Die Erzeugung von 3T3 Zelllinien mit stabiler Expression von EGFP-La wt und EGFP-La_{C₁₈A_{C₂₃₂A_{C₂₄₅}}.} (A) Schematische Darstellung der entstandenen EGFP-La Fusionsproteine. (B) Bilder fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der erzeugten 3T3 Zelllinien mit stabiler EGFP-La Protein Expression. Die Zellkerne, welche mit DAPI angefärbt wurden, sind in cyan dargestellt (Bild a & d). Das EGFP-Signal der Fusionsproteine zeigte sich durch Grünfärbung zum Beispiel in Bild (b) & (e). In den Bildüberlagerungen aus Phasenkontrastaufnahme, DAPI-Signal und EGFP-Signal in Bild (c) & (f) zeigte sich, dass die EGFP-La Fusionsproteine im Zellkern lokalisiert sind. Zur quantitativen Analyse der Zellen bezüglich der EGFP-La Fusionsproteinexpression wurden FACS Analysen durchgeführt. Es wurde deutlich, dass beide erzeugten 3T3 Zelllinien zu 99 % positiv für die Expression der gewünschten EGFP-La Fusionsproteine waren.

Die lentiviralen Vektoren mit den EGFP-La Fusionsproteinen wurden anschließend genutzt um murine Fibroblasten der Zelllinie 3T3 zu transduzieren, damit diese stabil EGFP-La wt beziehungsweise EGFP-La_{C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A} exprimieren konnten. Die erhaltenen 3T3-EGFP-La wt und 3T3-EGFP-La_{C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A} Zellen dienten in späteren Experimenten als wichtige Untersuchungsobjekte. Die schematische Darstellung der EGFP-La Fusionsproteine und der Beleg für die erfolgreiche Transduktion von 3T3 Zellen für eine stabile Expression dieser Konstrukte zeigt die Abbildung 27. Hierfür wurden sowohl fluoreszenzmikroskopische Analysen der 3T3 EGFP-La wt und 3T3 EGFP-La_{C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A} Zellen als auch durchflusszytometrische Messungen (FACS) durchgeführt. Die erhaltenen stabilen Zelllinien waren Grundlage für die folgenden Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung in Zellen.

4.2.4.2 Antigenerkennung durch SW5, 5B9, 7B6 und 312B in 3T3 EGFP-La wt und 3T3 EGFP-La_{C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A} Zellen

Nachdem bereits die redoxabhängige Antigenerkennung rekombinanten La Proteins und dessen Cysteinmutanten analysiert wurden, sollte nun die Antigenerkennung durch SW5, 5B9, 7B6 und 312B in Zellen untersucht werden. Dafür wurden die in 4.7.1 erzeugten 3T3 EGFP-La wt und 3T3 EGFP-La_{C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A} Zellen verwendet. Diese Zellen lagen für die Analyse fixiert und permeabilisiert vor. Die Resultate der ersten intrazellulären Färbungen mit den vier verschiedenen *anti*-La mAK sind in Abbildung 28 abgebildet.

Mit Hilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die *anti*-La mAK SW5 und 5B9 ohne weiteres in der Lage waren, das La Protein im Zellkern anzufärben. Wie schon bei den Experimenten mit den rekombinanten La Proteinen, zeigten sie keine offensichtlichen Unterschiede in der Erkennung von La wt oder der Tripelcysteinmutante. Bei dem Vergleich der in rot dargestellten *anti*-La Färbung und dem grünen Fluoreszenzsignal der EGFP-La Fusionsproteine fallen jedoch für beide *anti*-La mAK, SW5 und 5B9, kleine Unterschiede auf. So sind in den Bildern (b) und (f) beider Bildtafeln keine homogenen roten Flächen der *anti*-La gefärbten Zellbereiche zu sehen. Stattdessen zeigten sich Bereiche schwächerer Farbtintensität bis hin zu schwarzen Aussparungen. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Nukleoli handelt, welche zu diesem Zeitpunkt kein nachweisbares La Protein beinhalteten. In den Bildern (c) und (g) beider Bildtafeln wurde die Lokalisation der EGFP-La Proteine wiedergegeben. Hier konnte eine eher homogene Verteilung des grünen Fluoreszenzsignals im Zellkern beobachtet werden. Besonders deutlich wurden diese Unterschiede durch die Überlagerungen beider Fluoreszenzsignale, Bilder (d) und (h) beider Bildtafeln. Diese Unterschiede im Bezug auf die La Proteine können mit Hilfe von zwei möglichen Theorien erklärt werden. Zum einen könnte es sich um ein Artefakt der Fluoreszenzmikroskopie handeln.

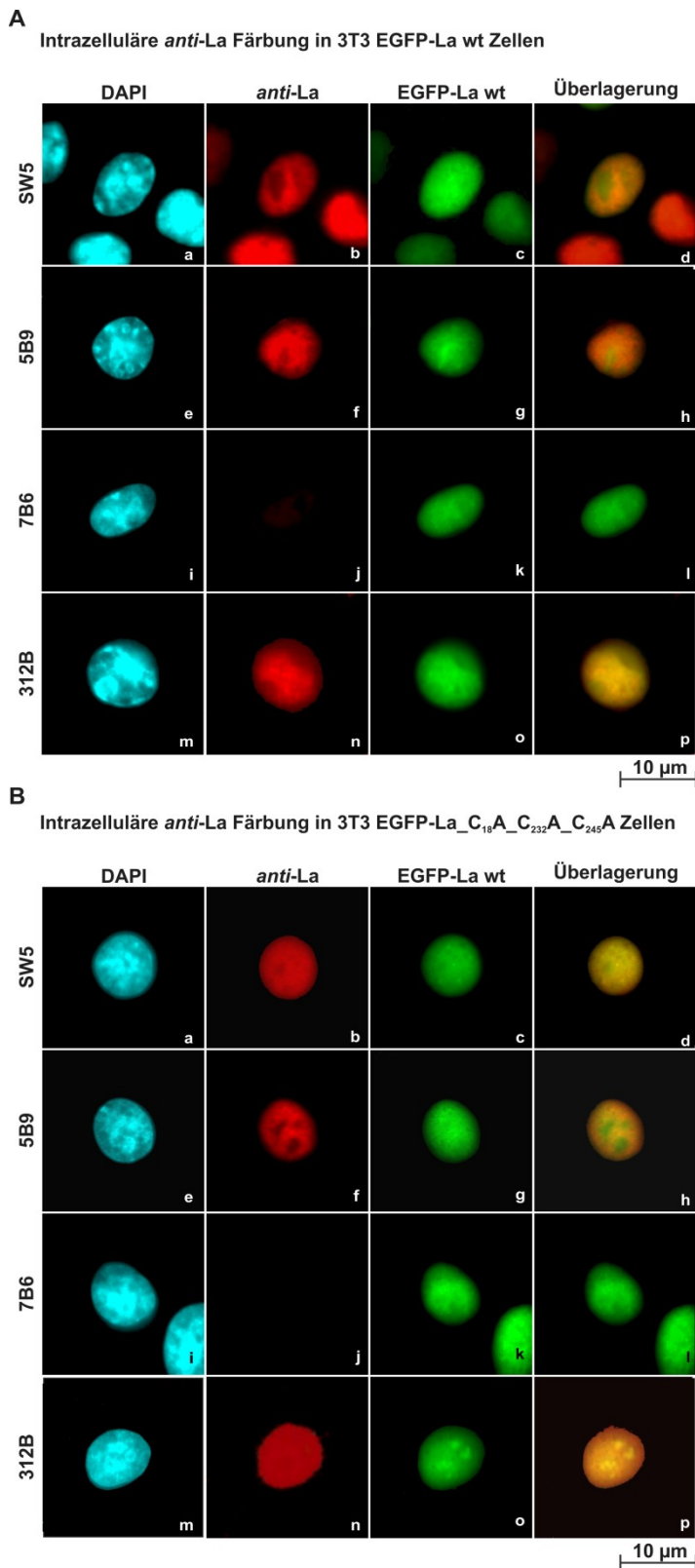


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Studien zur intrazellulären La Proteinerkennung durch die *anti*-La mAK SW5, 5B9, 7B6 und 312B in 3T3 Zellen mit Überexpression von EGFP-La wt beziehungsweise EGFP-La_{C₁₈A}_{C₂₃₂A}_{C₂₄₅A}. Für die Analyse von intrazellulärem La Protein wurden die Zelllinien 3T3 EGFP-La wt (A) und 3T3 EGFP-La_{C₁₈A}_{C₂₃₂A}_{C₂₄₅A} (B) verwendet. Auf fixierten und permeabilisierten Zellen wurden die *anti*-La Färbungen durch 5 µg/ml SW5, 5B9, 7B6 beziehungsweise 312B kontrolliert. Als Sekundärantikörper wurde ein *goat anti-mouse*-IgG-Alexa647 (1:400) verwendet. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die beiden Bildtafeln zeigen untereinander in den einzelnen Reihen die Ergebnisse für die Probenanalyse mit den verschiedenen *anti*-La mAK. Beginnend in der ersten Spalte ist jeweils der DAPI-gefärbte Zellkern einer exemplarischen Zelle in hellblau dargestellt (a, e, i, m). Die Signale der *anti*-La Färbung der gleichen Zelle sind in rot in der zweiten Spalte der Bildtafeln zu sehen (b, f, j, n). Die dritte Spalte (c, g, k, o) gibt in grün die EGFP-Signale jener Zellen wieder, welche durch die Anregung der EGFP-La Fusionsproteine hervorgerufen wurden. Die Bildtafeln werden durch eine vierte Spalte vervollständigt, welche die Überlagerung der *anti*-La Färbung (rot) und der EGFP-Signale (grün) zeigt. Eine Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzsignale resultierte in der Entstehung einer gelb-organen Mischfarbe.

Dieses hätte durch die leicht voneinander abweichenden Fokusebenen für die einzelnen Fluoreszenzsignale entstehen können, wobei die Fokusebene des roten Kanals diverse Nukleoli anschnitt, während die Fokusebene des grünen Kanals oberhalb oder unterhalb der Nukleoli lokalisiert war. Eine zweite Erklärung für das beobachtete Phänomen könnte an der Antigenerkennung der *anti*-La mAK selbst liegen. Sowohl der SW5 als auch der 5B9 mAK waren zwar in der Lage generell La wt und die Mutante zu erkennen, jedoch könnten auch Submengen des Proteins vorhandensein, zum Beispiel in den Nukleoli, welche nicht durch diese Antikörper detektiert werden konnten.

Weitere interessante Ergebnisse zeigten sich bei der Analyse der 7B6-Zellfärbungen. War der *anti*-La mAK 7B6 noch in Lage oxidiertes und reduziertes La Protein im ELISA oder auf einem *Westernblot* zu erkennen, so zeigten sich bei diesen Experiment annähernd bis gar keine positiven Signale, Bild (j) in beiden Bildtafeln. Eine intrazelluläre *anti*-La Färbung mit dem 7B6 mAK war sowohl in den 3T3 EGFP-La wt Zellen, als auch in den 3T3-EGFP-La_{C18A_C232A_C245A} Zellen nicht möglich. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen aus der Arbeit von C. Franke 2009 [109], wie sie bereits im Abschnitt 1.5.3 beschrieben wurden. Darin war zu lesen, dass der 7B6 Antikörper intrazelluläres La Protein nur detektieren kann, wenn die Zellen zuvor oxidativem Stress ausgesetzt waren.

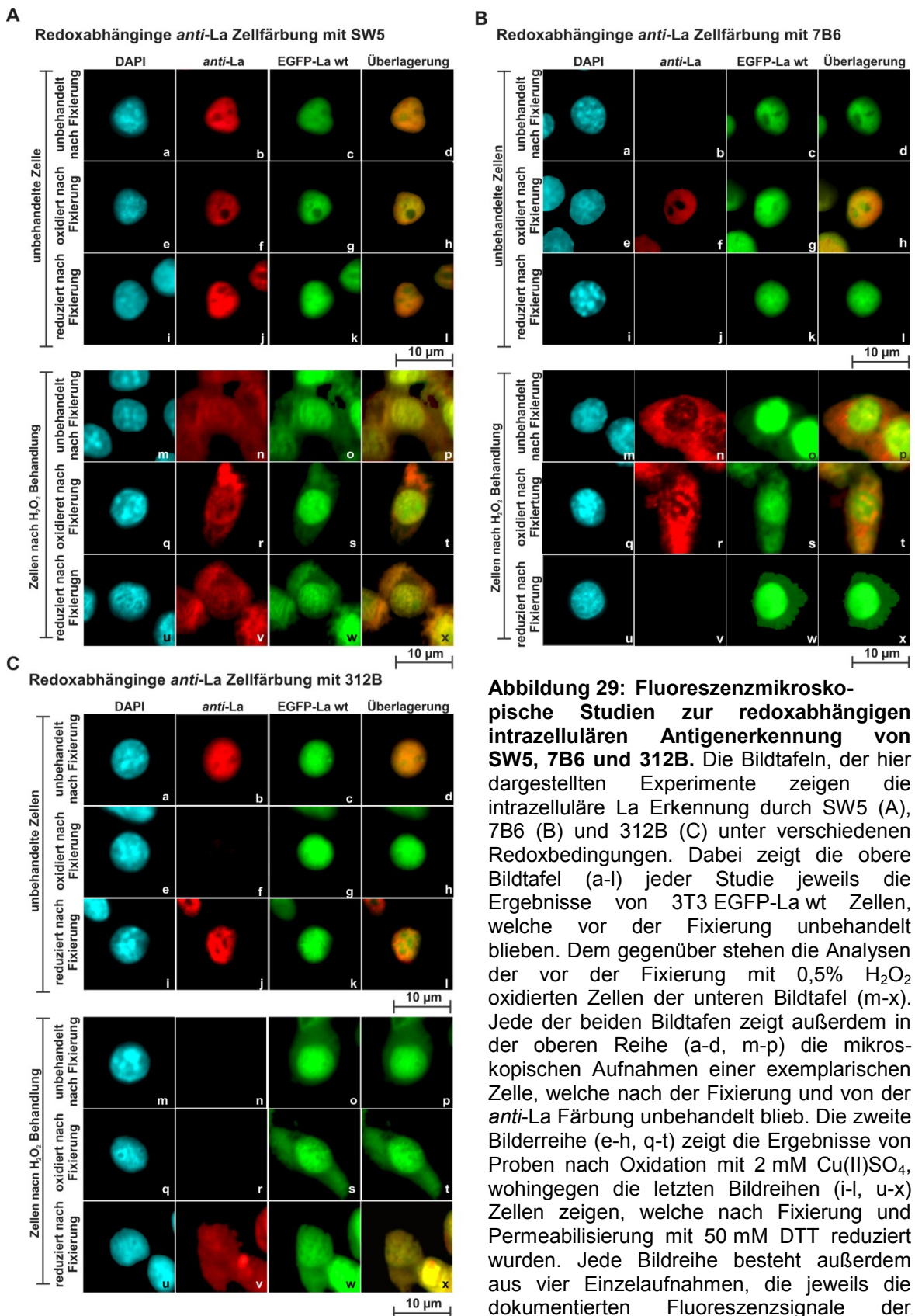
Die 312B-Zellfärbungen ließen sich ebenfalls mit den entsprechenden ELISA- und *Westernblot*-Analysen der rekombinanten La Proteine vergleichen. Der 312B mAK war in der Lage, das permanent reduzierte La des Fusionsproteins EGFP-La_{C18A_C232A_C245A} in 3T3 Zellen anzufärben. Auch konnte die Wildtypvariante in den 3T3 EGFP-La wt Zellen mit Hilfe dieses *anti*-La mAKs nachgewiesen werden. In den ELISA- und *Westernblot*-Analysen war La wt nur dann mit dem 312B mAK detektierbar, wenn das Protein reduziert vorlag. Somit konnte als wichtige Erkenntnis diesem Versuch entnommen werden, dass das La Protein unter physiologischen Bedingungen im Zellkern reduziert vorkommt.

4.2.4.3 Redoxabhängige Antigenerkennung durch SW5, 7B6 und 312B in 3T3-La wt Zellen

Um die Antigenerkennung in Zellen durch die *anti*-La mAK 7B6 und 312B bezüglich ihrer Redoxabhängigkeit noch genauer zu verifizieren, wurde eine weitere, umfangreichere Zellfärbungsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden wiederum die 3T3-EGFP La wt Zellen verwendet. Als Vergleichsantikörper für eine redoxunabhängige *anti*-La Färbung kam der SW5 zum Einsatz. Die Analyse war insgesamt sehr komplex, sechs verschiedene Proben wurden für die Antigenerkennungsanalysen für jeden der drei *anti*-La mAK vorbereitet. Die Zellen der ersten drei Proben blieben vor der Fixierung, Permeabilisierung und *anti*-La Färbung unbehandelt. Sie sollten die Zellen unter physiologischen Bedingungen

repräsentieren. Die anderen drei Proben wurden vor der Fixierung, Permeabilisierung und *anti-La* Färbung mit 0,5 % H_2O_2 oxidiert. Diese Zellen reflektierten die Situation nach Einfluss von oxidativem Stress. Alle drei Proben dieser beiden Gruppen wurden zusätzlich noch ein weiteres Mal untergliedert. Sie blieben nach der Fixierung und Permeabilisierung entweder unbehandelt, oder wurden mit 2 mM Cu(II)SO_4 oxidiert beziehungsweise mit 50 mM DTT reduziert. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 29 dargestellt. Zunächst sollen hier die Resultate der Analyse mit dem Kontrollantikörper SW5 zusammengefasst werden, siehe Abbildung 29 (A). Mit Hilfe des SW5 Antikörpers konnte in allen sechs Proben das La Protein in den Zellen nachgewiesen werden. Bei Zellen ohne zusätzlicher H_2O_2 Behandlung (obere Bildtafel) war das La Protein im Zellkern lokalisiert. Dies lässt sich mit der Deckungsgleichheit der Zellkernfärbung (hellblau) und der *anti-La* Färbung (rot) belegen. Die schwarzen, kreisrunden Aussparungen bei den Bildern der *anti-La* Färbung zeigen vermutlich die Nukleoli der Zellkerne. Im Gegensatz zu den Resultaten aus dem vorangegangenen Experiment, siehe Abbildung 29 (A) obere Bildreihe, deckten sich hier die schwarzen Aussparungen bei der *anti-La* Färbung weitestgehend mit den Resultaten der dokumentierten Signale im grünen Kanal der EGFP-La Fusionsproteine. Dadurch wird die Vermutung gestützt, dass es sich hierbei um Nukleoli handelte. Das heißt, in den vorliegenden Beispielen war das La Protein im Nukleoplasma und nicht in den Nukleoli lokalisiert. Da die Proben aller Zellen ohne zusätzliche H_2O_2 Behandlung das gleiche Färbemuster zeigten, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die nachträgliche Oxidation oder Reduktion des Antigens keinen Einfluss auf die Erkennung durch den SW5 hat. In der unteren Bildtafel von Abbildung 29 (A) sind die Ergebnisse der H_2O_2 behandelten Zellfärbungen zu sehen. Besonders auffällig dabei war, dass sich die Lokalisation des La Proteins veränderte. Auf Grund der Oxidation kam es zu einer Anreicherung des La Proteins im Zytoplasma, was sowohl in durch die Lokalisation der EGFP-La Fusionsproteine (dritte Bildspalte, Bilder o, s, w) als auch durch die *anti-La* Färbungen (zweite Bildspalte, Bilder n, r, v) ersichtlich wurde. Die beobachtete zytoplasmatische La Anreicherung stimmte mit den Hinweisen der Literatur überein (siehe Abschnitt 1.4.4). Sowohl das zytoplasmatische EGFP-La wt, als auch der im Zellkern verbliebene Anteil des EGFP-La wt Fusionsproteins konnten durch SW5 nachgewiesen werden. Eine weitere Behandlung, Oxidation oder Reduktion nach der Probenfixierung und –permeabilisierung, hatte demnach keinen Einfluss auf die Antigenerkennung durch diesen *anti-La* mAK.

Die redoxabhängigen *anti-La* Zellfärbungen mit dem 7B6 unterschieden sich von den Resultaten der SW5-Zellfärbungen hingegen sehr deutlich, siehe Abbildung 29 (B). Der 7B6 Antikörper war nur in der Lage, in der Hälfte der Proben das La des EGFP-La wt



unterschiedlichen Farbkanäle einer exemplarischen Zelle zeigen. In hellblau sind die DAPI gefärbten Zellkerne zu erkennen, in rot die Ergebnisse der *anti-La* Färbung, entstanden durch die Verwendung von SW5, 7B6 und 312B in Kombination mit dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse-IgG-Alexa647* (1:400). Die dritte Spalte jeder Bildreihe zeigt das grüne EGFP-Signals, erhalten durch die Anregung der EGFP-La Fusionsproteine. Es dient zur Kontrolle der Lokalisation der rekombinant überexprimierten La Proteine. In einer vierten Spalte ist die Überlagerung der *anti-La* Färbung mit dem EGFP-Signal der La Fusionsproteine dargestellt. So sollten eventuelle Unterschiede zwischen La Lokalisation und La Detektion durch die verschiedenen mAK unter den einzelnen experimentellen Gegebenheiten dokumentiert werden.

Fusionsproteins nachzuweisen. Waren die Zellen gänzlich unbehandelt, war keine La Proteinerkennung durch den 7B6 möglich (obere Bildtafel, Bild b). Ebenso verhielt es sich, wenn die unbehandelten Proben nach der Fixierung und Permeabilisierung zusätzlich reduziert wurden (obere Bildtafel, Bild j). Eine schwache und nicht in allen Zellen der Probe beobachtbare *anti-La* Färbung mit dem 7B6 zeigte sich nach Oxidation der fixierten und permeabilisierten Zellen (obere Bildtafel, Bild f). Wurden die Zellen jedoch vor der Fixierung mit H_2O_2 oxidativem Stress ausgesetzt, konnte der 7B6 das La des EGFP-La wt Fusionsproteins erkennen (untere Bildtafel, Bild n). Entsprechend der Erwartungen auf Grund der Literaturkenntnisse und der SW5-Resultate war auch hier eine zytoplasmatische Anreicherung des Fusionsproteins zu beobachten. Ein ähnliches Färbepild zeigten die Proben, welche nach der Fixierung zusätzlich mit Cu(II)SO_4 oxidiert wurden (untere Bildtafel, mittlere Bildreihe). Interessant war das Ergebnis der Zellfärbungen, in welchen die mit H_2O_2 oxidierte Probe nach der Fixierung und Permeabilisierung wieder mit DTT reduziert wurden (untere Bildtafel, Bild v). In Zellen dieser Probe konnte mit dem 7B6 kein La detektiert werden. Daher musste an dieser Stelle des Experimentes angenommen werden, dass der Redoxzustand des zellulären La Proteins scheinbar einen Einfluss auf die Erkennung durch den 7B6 mAK hatte. Dies würde aber im Widerspruch mit den Resultaten der ELISA- und *Westernblot*-Analysen stehen. Eine Erklärung, welche alle Resultate in einer Theorie vereinigt, wäre die Folgende: Die Erkennung des La Proteins in Zellen ist nicht vom Redoxzustand des Proteins selbst abhängig. Vielmehr scheint die Epitopzugänglichkeit redoxabhängig zu sein. Dabei liegt das Epitop im oxidierten Zustand des Proteins frei zugänglich vor, während es unter reduzierten Bedingungen im Zellkern wohl verdeckt ist.

In den letzten beiden Bildtafeln in Abbildung 29 (C) sind die Resultate der redoxabhängigen intrazellulären La Detektion durch den 312B dargestellt. Es zeigte sich, dass der 312B in komplett unbehandelten Zellen das La Protein im Zellkern nachweisen konnte (obere Bildtafel, Bild b). Durch eine zusätzliche Reduktion der Proben nach der Fixierung und Permeabilisierung wurde diese Antigenerkennung nicht beeinflusst (obere Bildtafel, Bild j). Anders verhielt es sich nach einer zusätzlichen Probenoxidation. Durch

diese ging die Antigenerkennung durch den 312B verloren (obere Bildtafel, mittlere Bildreihe). Waren die Zellen vor der Fixierung oxidativem Stress ausgesetzt, so konnte der 312B sein Antigen nicht mehr erkennen (unter Bildtafel, obere und mittlere Bildreihe). Ausnahme bestand bei den Proben, welche nach der Fixierung und Permeabilisierung zusätzlich mit DTT reduziert wurden (untere Bildtafel, Bild v). Für diese Proben konnte eine schwache positive *anti*-La Färbung durch den 312B dokumentiert werden. Die verminderte Signalintensität jener *anti*-La Färbung ist wahrscheinlich auf die vorangegangene starke Oxidation und im Vergleich dazu vermutlich schwache Rückreduktion des untersuchten La Proteins zurückzuführen. Trotzdem war es möglich auch bei diesen Proben, die schon zuvor beobachtete zytoplasmatische La Anreicherung mit Hilfe des 312B mAKs nachzuweisen.

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment folgendes festgestellt werden. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich das EGFP-La wt Fusionsprotein im Zellkern. Nach H₂O₂ Behandlung kommt es zu einer Anreicherung desselben im Zytoplasma. Der *anti*-La mAK SW5 kann das La im EGFP-La wt Fusionsprotein detektieren, unabhängig von dessen Lokalisation und der vorangegangenen Behandlung der Zellen, egal ob Probenoxidation oder -reduktion. Der *anti*-La mAK 312B war in der Lage reduziertes La Protein in den Zellen zu erkennen. Dabei war es nicht von Belang, ob das EGFP-La wt Fusionsprotein vor der Fixierung im Zellkern oder im Zellplasma lokalisiert war. Wurden die Proben jedoch vor oder nach der Fixierung oxidiert, war eine Färbung mit dem 312B nicht mehr möglich. Diese Daten decken sich mit denen Untersuchungen der redoxabhängigen Antigenerkennung für die rekombinanten La Proteine in Abschnitt 4.2.4.2. Darüber hinaus ließ sich dokumentieren, dass der 312B Antikörper das La Protein im Zellkern unbehandelter Zellen detektieren konnte. Dies belegt nochmals den Verdacht, wie bereits im Experiment von Abbildung 27 bekannt, dass das La Protein im Zellkern im reduzierten Zustand vorliegt. Die Resultate dieser Studie mit dem 7B6 lassen sich wie folgt zusammenfassen. Entgegen der Daten aus den Analysen in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 zeigte sich bei den Zellfärbungen eine gewisse Redoxabhängigkeit der Antigenerkennung mit dem 7B6. Der *anti*-La mAK 7B6 war nur in der Lage das La des EGFP-La wt Fusionsproteins in den 3T3 Zellen zu erkennen, wenn diese vor oder nach der Fixierung oxidiert wurden sind. Dabei anzumerken ist, dass die H₂O₂ Behandlung noch lebender Zellen zu einem stärkeren *anti*-La Signal führte als die Oxidation bereits fixierter Zellen.

4.3 Analysen zur Bestimmung biophysikalischer Grundlagen der La Redoxsensitivität

Die Ergebnisse der folgenden biophysikalischen Studien wurden durch die Unterstützung des Kooperationspartners Herrn Prof. Dr. Fahmy und dessen Kollegen erlangt.

4.3.1 Aufzeichnung der CD-Spektren von La wt und dessen Cysteinmutanten, sowie die Ermittlung der Helikalität

Um zu untersuchen, ob die beobachteten redoxabhängigen Antigenerkennungen der Antikörper 312B und 2F9 durch Umfaltungsprozesse des La Proteins auf molekularer Ebene erklärbar wären, wurden Messungen zum Circular dichroismus der La Proteine, kurz CD-Spektrenmessungen, durchgeführt. Mit solchen CD-Spektren können Sekundärstrukturen von Peptiden und Proteinen analysiert werden. Auch ist es möglich Konformationsänderungen zu verfolgen, bedingt durch den Einfluss von Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration oder speziellen Bindepartnern.

In den vorangegangenen Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung durch die verschiedenen *anti*-La mAk wurden die La Proteine bereits durch den Einsatz von Cu(II)SO₄ oxidiert. Daher sollten für die La Proteine CD-Spektren in Ab- und Anwesenheit von Cu²⁺ Ionen aufgezeichnet werden. Unterschiede zwischen den ermittelten CD-Spektren belegen dann eine Konformationsänderung auf Grund des oxidativen Einflusses von Cu(II)SO₄ auf die La Proteine. Die Resultate dieser Experimente sind in Abbildung 30 dargestellt. Wie man den Grafen entnehmen kann, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den in den ermittelten Spektren bei den Analysen von La wt, der Monocysteinmutante La_C₁₈A und der Doppelcysteinmutante La_C₂₃₂A_C₂₄₅A. Durch die Anwesenheit von Kupferionen kam es zu Verschiebungen in den Spektren. Dies traf für alle La Proteine zu, die noch über mindestens ein Cystein verfügen. Waren keine Cysteine mehr vorhanden, wie im Fall der Tripelcysteinmutante, kam es zu keinerlei Verschiebungen im Spektrum. Das bedeutet, die Konformation des La Proteins wurde durch die Cu²⁺ Ionen beeinflusst, unter der Voraussetzung des Vorhandenseins von Cysteinen.

Mit den ermittelten CD-Spektren konnten außerdem prozentuale Sekundärstrukturanalysen der vier La Proteine durchgeführt werden, inklusive der Bestimmung der Helikalität der gesamten Proteine. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 und Tabelle 31 aufgelistet. In den Tabellen wurden für jedes La Protein neben der Gesamthelikalität auch die Anteile der verschiedenen Proteinsekundärstrukturen angegeben. Dabei ist der Anteil der regulär geformten α -Helices als „*helix* 1“ angegeben, der Anteil verzogener α -Helices verbirgt sich hinter dem Wert „*helix* 2“. Ebenso sind die Anteile regulär geformter β -Stränge (*strand* 1), verkrümmter β -Stränge (*strand* 2), sowie von die Anteile an Schleifen

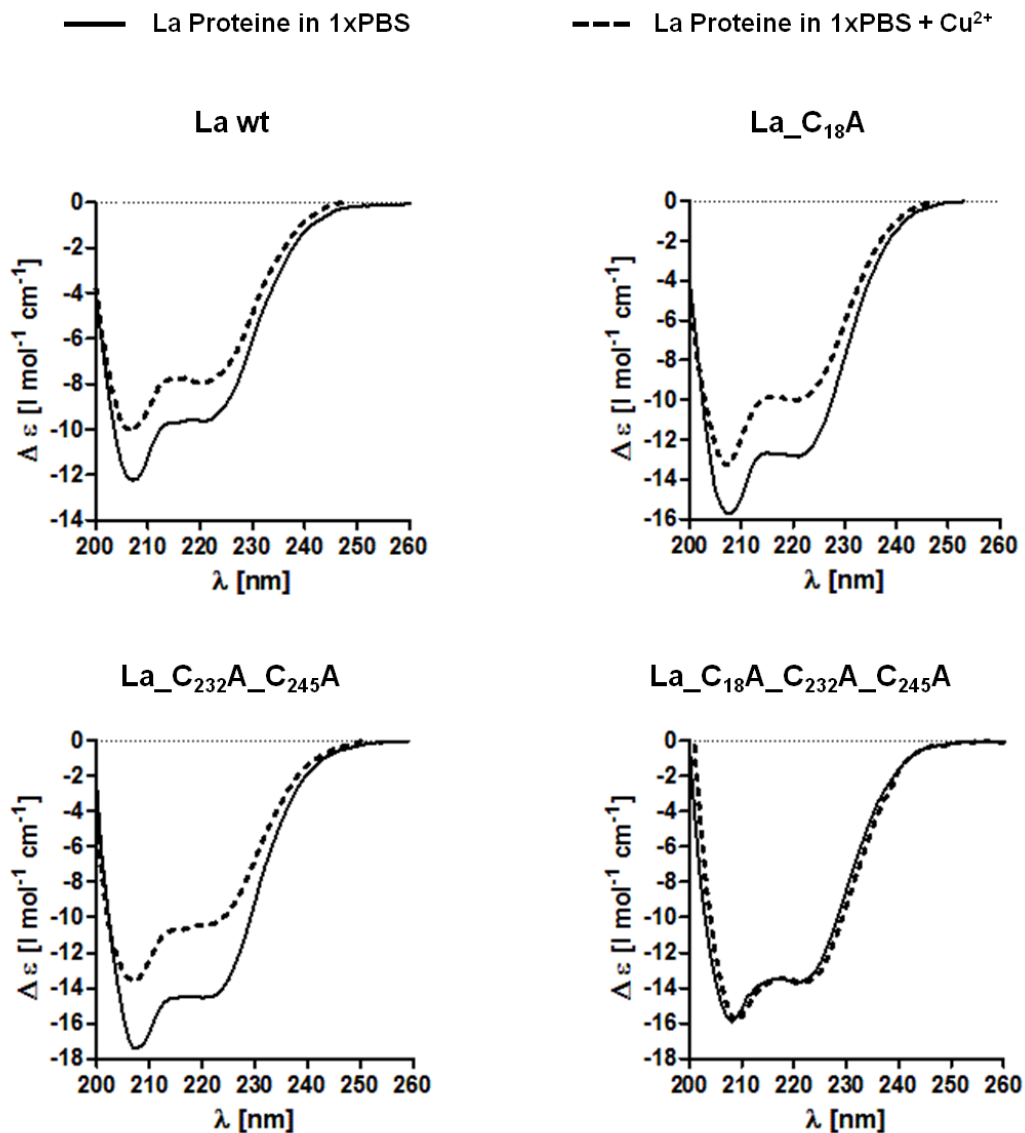


Abbildung 30: CD-Spektren der vier La Proteine in Ab- und Anwesenheit von Cu^{2+} Ionen. Für die Spektren-Aufzeichnungen wurden die La Proteine in 1x PBS verdünnt (durchgehende Linie) beziehungsweise in 90 μM Cu(II)SO_4 (gestrichelte Linie).

(*turns*) und unstrukturierten Sequenzabschnitten (*unordered*) aufgelistet. Die Art der Klassifizierung geht auf Sreerema *et al.* 1999 [131] zurück. Die Bestimmungen der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen der La Proteine ergab folgendes Bild. Waren die La Proteine in 1x PBS gelöst, so bestanden sie im Mittel zu 50 % aus α -Helices (Helikalität). War das Cystein an Position 18 noch vorhanden, wie im La wt und in der Doppelcysteinmutante La_C232A_C245A, so zeigte sich außerdem eine deutliche Beeinflussung der Sekundärstruktur durch die Anwesenheit von Kupferionen. Im Fall von La wt verminderte sich der helikale Anteil des Proteins von anfänglich 55 % auf 29 % in Anwesenheit von Kupfer. Die Doppelcysteinmutante zeigte eine Verminderung der Helikalität von 63 % auf 47 %. Diese Strukturveränderung war bei beiden Proteinen

Tabelle 30: Sekundärstrukturanteile und Helikalität von La wt und der Monocysteinmutante La_C₁₈A. Die Daten wurden mit Hilfe des Auswertalgorithmuses CDSSTR (*modification of variable selection method*) erhoben, sowie unter Verwendung der Referenzdatenbank 4 für Proteinanalysen im Wellenlängenbereich von 190 – 240 nm.

		La wt		La_C ₁₈ A	
		in 1x PBS	in 1x PBS + Cu ²⁺	in 1x PBS	in 1x PBS + Cu ²⁺
Helikalität des Gesamtproteins		55 %	29 %	50 %	58 %
Anteile verschiedener Proteinsekundärstrukturen	<i>helix 1</i>	0,44	0,22	0,41	0,51
	<i>helix 2</i>	0,11	0,07	0,09	0,07
	<i>strand 1</i>	0,08	0,15	0,13	0,11
	<i>strand 2</i>	0,08	0,11	0,09	0,06
	<i>turns</i>	0,07	0,20	0,08	0,05
	<i>unordered</i>	0,21	0,25	0,25	0,19
	total	0,99	1	0,99	0,99

Tabelle 31: Sekundärstrukturanteile und Helikalität der Doppelcysteinmutante La_C₂₃₂A_C₂₄₅A und der Tripelcysteinmutante La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A. Die Daten wurden mit Hilfe der CDSSTR Methode erhoben, sowie unter Verwendung der Referenzdatenbank 4 für Proteinanalysen im Wellenlängenbereich von 190 – 240 nm.

		La_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A		La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A	
		in 1x PBS	in 1x PBS + Cu ²⁺	in 1x PBS	in 1x PBS + Cu ²⁺
Helikalität des Gesamtproteins		63 %	47 %	44 %	42 %
Anteile verschiedener Proteinsekundärstrukturen	<i>helix 1</i>	0,48	0,37	0,35	0,35
	<i>helix 2</i>	0,15	0,10	0,09	0,07
	<i>strand 1</i>	0,09	0,14	0,14	0,16
	<i>strand 2</i>	0,04	0,09	0,10	0,10
	<i>turns</i>	0,06	0,09	0,11	0,10
	<i>unordered</i>	0,17	0,20	0,21	0,22
	total	0,99	0,99	1	1

hauptsächlich für den Typus *helix* 1 zu verzeichnen. Denen gegenüber standen die Resultate für die Monocysteinmutante La_C₁₈A und die Tripelcysteinmutante La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A. Für beide wurde in Ab- und Anwesenheit jeweils annähernd die gleiche Helikalität bestimmt. Hier zeigte die Anwesenheit von Kupferionen keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil von α -Helices. Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich auch die redoxabhängige Antigenerkennung durch die *anti*-La mAK der 312B Gruppe erklären. Ihre Epitope liegen im N-terminalen Bereich von La, wie in Abschnitt 1.5.4 beschrieben. Dieser Sequenzabschnitt ist durch die α -Helices des La Motives (siehe Abbildung 3), sowie das Cystein an Position 18 charakterisiert. Kommt es nun durch Oxidation zur Verminderung der Helikalität des La Proteins, also zum Aufbrechen der α -Helixstruktur, dann führt diese Veränderung der räumlichen Struktur zum Verlust des Epitops von 312B beziehungsweise dessen verwandte *anti*-La mAK.

4.3.2 Bestimmung der Schmelztemperatur von La wt und der Tripelcysteinmutante

Wie oben beschrieben, konnte gezeigt werden, dass es durch die Anwesenheit von Kupferionen zur Veränderung in der Sekundärstruktur von La wt kommt. Anschließend sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine solche Strukturänderung auch mit einem abweichenden Denaturierungsverhalten und einer Änderung der Schmelztemperatur einhergeht. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Analysen zur thermischen Denaturierung für La wt und die Tripelcysteinmutante in Ab- und Anwesenheit von Kupferionen durchgeführt. Die grafische Aufarbeitung der Resultate dieses Experiments sind in Abbildung 31 dargestellt. Hierbei wurden die gemittelten Ellipsizitäten für die Anregungen von α -Helices in CD-Spektroskopieanalysen gegen die Temperatur aufgetragen. Die erhaltenen Grafen sind wie folgt zu lesen. Ein Anstieg der Temperatur hatte in der Regel einen Anstieg der Ellipsizität zur Folge, welche gleichbedeutend mit einem Verlust der Sekundärstrukturelemente, also einem Aufbrechen der eigentlichen Proteinstruktur war. Die Kurven beschrieben einen sigmodidalen Verlauf. Das Erreichen des Plateaus einer solchen Kurve repräsentiert den nahezu kompletten Verlust der beobachteten Sekundärstruktur, also eine Denaturierung des untersuchten Proteins. Je steiler der Anstieg der Kurven im linearen Bereich desto schneller verlief die Denaturierung. Über die Bestimmung der Wendepunkte wurden die Schmelztemperaturen der Proteine ermittelt.

Aus den Daten war zu erkennen, dass die Trippelcysteinmutante La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A, gelöst in 1x PBS, die stabilste Variation des La Proteins darstellte. Die Untersuchungen zeigten den Kurvenverlauf (rot) mit dem geringsten Anstieg und der höchsten Schmelztemperatur (T_m) von 43 °C. Die Anwesenheit von Kupferionen zeigte nur geringe Veränderungen des Kurvenverlaufs (gelb) und eine Verminderung der Schmelztemperatur

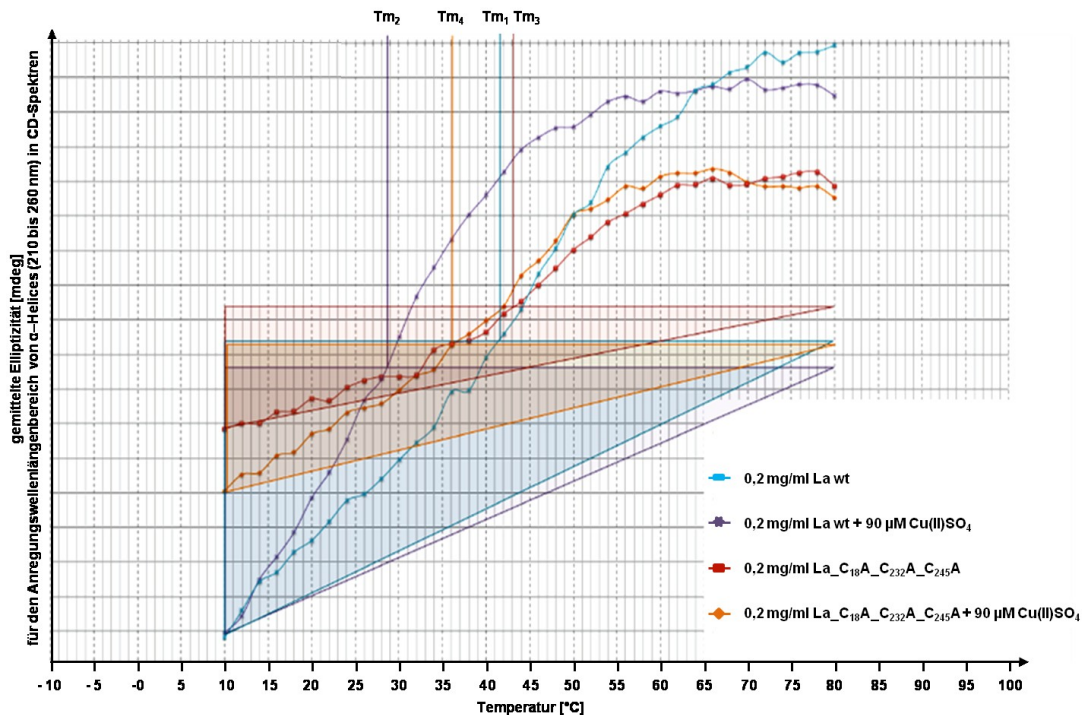


Abbildung 31: Ermittlung der thermischen Denaturierung für La wt und La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A in Ab- und Anwesenheit von Cu(II)SO₄. Die hier gezeigten Daten geben einen repräsentativen Versuch zur Bestimmung der Schmelztemperaturen von La wt und der Tripelcysteinmutante wieder. Dafür lagen die Proteine gelöst in 1x PBS mit oder ohne Cu(II)SO₄ vor. Von diesen Proben wurden CD-Spektren aufgezeichnet während stetig die Temperatur der Proben um 2,5 °C erhöht wurde. Die Messungen fanden für eine Gesamttemperaturspanne von 10 – 80 °C statt. Anschließend wurden die gemittelten Elliptizitäten aus den CD-Spektren für den Anregungswellenlängenbereich für α -Helices (210 - 260 nm) bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen. Aus den erlangten Kurven konnten abschließend die Schmelztemperaturen der einzelnen Proben (Tm₁ bis Tm₄) bestimmt werden.

um 7 °C auf 36 °C. Anderes ergaben die Analysen für das La Wildtypprotein. Hierbei wurde schon in Abwesenheit von Kupferionen eine Veränderung der Elliptizität dokumentiert, welche sich mit steigender Temperatur wesentlich stärker veränderte, als es für die Trippelcysteinmutante beobachtet wurde (blaue Kurve). Zu Beginn des Experiments, im Temperaturbereich zwischen 10 °C und 40 °C, wurden niedrigere mittlere Elliptizitäten für La wt bestimmt als für die Mutante. Dies wurde interpretiert als höherer Grad an Sekundärstrukturelementen, in diesem Fall α -Helices. Jedoch war für das Wildtypprotein auch ein wesentlich stärker Anstieg der Elliptizität zu beobachten, welches einem stärkeren Strukturverlust, beziehungsweise einer gesteigerten Temperaturempfindlichkeit gleichzusetzen war. Noch deutlicher wurde die erhöhte Sensitivität gegenüber der Temperatur in Anwesenheit von Kupferionen (violette Kurve). Durch Cu²⁺ im Lösungsmittel des La Proteins während des Experimentes stieg die Temperaturempfindlichkeit zwischen 15 °C und 40 °C deutlich an, welches sich im steileren Anstieg der violetten Kurve im Vergleich zu allen anderen zeigte. Der damit einhergehende Strukturverlust, spiegelte sich auch in der starken Verminderung der Schmelztemperatur von vormals 42 °C für das Wildtypprotein in 1x PBS auf 28 °C wider.

Zusammenfassen lassen sich die Resultate der biophysikalischen Untersuchungen zum La Protein und den vier Cysteinmutanten wie folgt: Das La Wildtypprotein zeigte einen höheren Anteil an α -Helices als die dauerhaft reduzierte Variante in Form der Trippelcysteinmutante. Das Vorhandensein der Cysteine schien außerdem hilfreich zu sein bei einer Konformationsänderung, wie zum Beispiel in Gegenwart von Kupferionen. Allerdings führte die Gegenwart der Cysteine auch zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Kupferionen und einer steigenden Umgebungstemperatur. Insgesamt sprachen die Daten dafür, dass das La Protein im reduzierten Zustand, beziehungsweise die Trippelcysteinmutanten als solche, die stabilere Konformation des Proteins darstellte. Die Konformation, welche das La Protein unter oxidativen Bedingungen einnimmt, ist wahrscheinlich stärker gespannt, energetisch ungünstiger und nur durch die Ausbildung von Cysteinbrücken für einen längeren Zeitraum möglich.

4.4 Physiologische Auswirkungen der La Redoxsensitivität

Nachdem in den vorangegangenen Studien die Redoxsensitivität des La Proteins als solches charakterisiert wurde, sollte im Folgenden deren Auswirkungen auf Verhalten und Funktion des La Proteins untersucht werden. Dafür wurden Analysen für die Verifizierung zur zytoplasmatischen Anreicherung von La durchgeführt. Außerdem war es von Interesse herauszufinden, wie es zur Exposition von La Protein auf der Oberfläche von lebenden Zellen kommen kann und inwieweit die Redoxsensitivität diesen Prozess beeinflusst. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Bedeutung die Cysteine beziehungsweise ein oxidierendes oder reduzierendes Milieu Einfluss auf die Bindung von Nukleinsäuren haben und damit auf die Funktionen des La Proteins. Abschließend sollte untersucht werden, inwiefern das La Protein in der Lage ist, eine Immunantwort zu induzieren, wie sie zum Beispiel bei SLE Patienten zu beobachten sind. Dafür stand die La induzierte Aktivierung von dendritischen Zellen im Fokus.

4.4.1 Sauerstoffstressbedingte Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung

Sowohl aus den vorangegangenen Studien, wie in 4.2.4.3, als auch aus der Literatur ist bekannt, dass oxidativer Stress, ausgelöst beispielsweise durch ultraviolette Strahlung [96] oder H_2O_2 Behandlung [109] zu einer zytoplasmatischen Anreicherung des La Proteins führt.

4.4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Quantifizierung der zytoplasmatischen La Anreicherung in 3T3 EGFP-La wt Zellen

Mit Hilfe der generierten Zelllinie 3T3 EGFP-La wt sollte zunächst getestet werden, ob es neben den bereits getesteten Stimuli noch weitere gibt, die zu einer zytoplasmatischen Anreicherung von La in den Zellen führen. Als Negativkontrolle wurden dafür Zellen ohne einen chemischen Zusatz im Kulturmedium, DMEM_{Standard}, eingesetzt. Zum Vergleich mit den bekannten Daten von C. Franke [109] wurden als Positivkontrolle 3T3 EGFP-La wt mit 0,5 % H₂O₂ behandelt, was einer Konzentration von 160 mM entsprach. Dabei handelte es sich um die geringste Konzentration von Wasserstoffperoxid, bei der eine Anreicherung des La Proteins im Zytoplasma nach etwa 20 Minuten zu beobachten war. Im vorliegenden Experiment wurde die La Lokalisation nach Inkubation mit 1 mM Fe(II)Cl₂, 1 mM Cu(II)SO₄, sowie 1 mM NO-Glutathion in DMEM_{Standard} neu getestet. Auch hierbei wurde eine Inkubation von 20 min eingehalten. Nach anschließender Probenfixierung und intrazellulärer Färbung mit 5 µg/ml *anti-La* SW5 und *goat anti-mouse-IgG-Alexa647* (1:400), wurden die Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht und quantitativ analysiert. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 32 dargestellt.

In Abbildung 32 (A) sind die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt. Dabei wurde pro Probe eine exemplarische Zelle in den Fokus gerückt und sowohl ihr DAPI-gefärbter Zellkern (hellblau, erstes Bild jeder Reihe), ihre *anti-La* Färbung (rot, zweites Bild jeder Reihe), eine Überlagerung dieser beiden Signale (drittes Bild jeder Reihe) und abschließend das EGFP-Signal des Fusionsproteins als Kontrolle (grün, letztes Bild jeder Reihe) dargestellt. Aus den Untersuchungen wurde deutlich, dass sich das La Protein ohne zusätzliche Stimulation im Zellkern aufhielt. Erkennbar ist dies in der starken Ähnlichkeit zwischen der *anti-La* Färbung (Bild b) und der Zellkernfärbung (Bild a) deutlich. Dieser Sachverhalt lässt sich auch der Überlagerungsdarstellung (Bild c) entnehmen. Dem gegenüber wiesen alle anderen Proben eine zytoplasmatische Anreicherung auf, welche sich durch ein flächenmäßig größeres, rot dargestelltes Zellareal im Vergleich zum DAPI-gefärbten Zellkernareal äußerte (Bilder g, k, o, s). Die Unterschiede ließen sich zudem quantifizieren, diese Resultate sind in Abbildung 32 (B) ersichtlich. Dabei stellte sich heraus, dass eine zwanzigminütige Stimulation durch H₂O₂, Fe(II)SO₄ und NO-Glutathion zu einer Anreicherung von La im Zytoplasma in 55 % bis 60 % der Zellen führte. Bei der Probe, welche mit Cu(II)SO₄ stimuliert wurde, zeigte sich immerhin in etwa 30 % der Zellen eine zytoplasmatische Anreicherung. Dass die Stimulation mit 1 mM Cu(II)SO₄ im Vergleich zu den anderen Stimuli zu einer schwächeren zytoplasmatischen La Anreicherung führte, wurde auch in den mikroskopischen Aufnahmen selbst ersichtlich. Für eine deutlich erkennbare zytoplasmatische Färbung mussten in Abbildung 32 (A) (Bilder j & k) Helligkeit und

Kontrast der Aufnahme stark angehoben werden, was sich in einer leichten Überbelichtung des Zellkerns (Bilder j & l) resultierte.

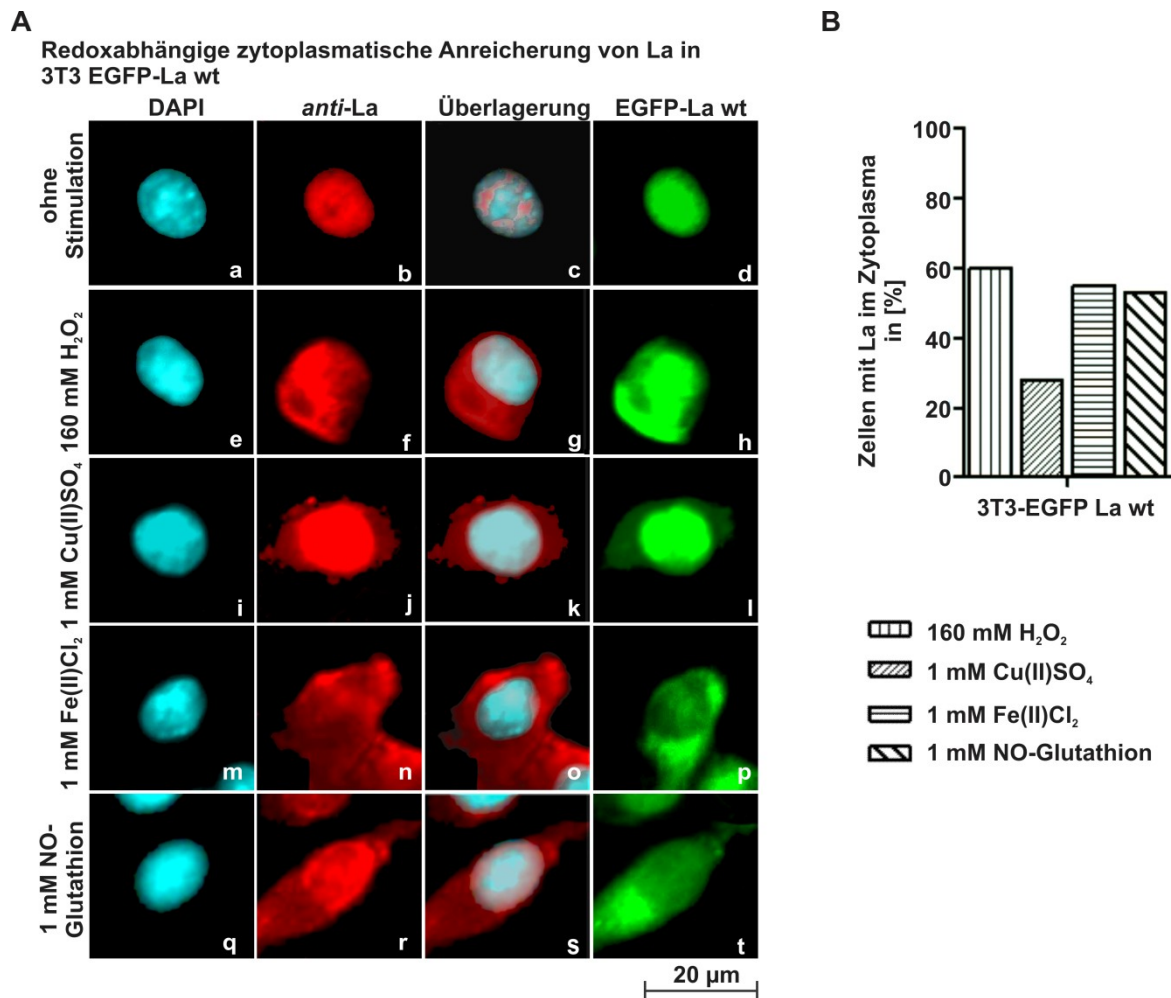


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in 3T3 EGFP-La wt Zellen nach receptorunabhängiger Induktion von oxidativen Stress. (A) Es wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen von 3T3 EGFP-La wt Zellen durchgeführt, wobei die Zellen vor Fixierung, Permeabilisierung und *anti-La* Färbung mit SW5 und *goat anti-mouse-IgG-Alexa647* zunächst mit verschiedenen sauerstoffstressinduzierenden Stimuli behandelt wurden. Die Behandlung erfolgte durch Zusatz von 160 mM H₂O₂, 1 mM Cu(II)SO₄, 1 mM Fe(II)Cl₂ beziehungsweise 1 mM NO-Glutathion im Medium für 20 min bei RT. Die Bildtafel zeigt als Ergebnis für die Behandlung mit den unterschiedlichen Stimuli jeweils eine exemplarische Zelle. Die Ergebnisse für die einzelnen Stimuli sind reihenweise untereinander angegeben. Jede Bildreihe repräsentiert zudem die Fluoreszenzsignale der einzelnen Farbkanäle nebeneinander. In hellblau sind die DAPI gefärbten Zellkerne zu erkennen, in rot die Ergebnisse der *anti-La* Färbung. Die dritte Spalte jeder Bildreihe zeigt einer Überlagerung der DAPI-Zellkern- und der *anti-La* Färbung für die bessere Bestimmung der La Proteinlokalisierung. Als Kontrolle wurde außerdem stets eine Untersuchung des EGFP-Signals (grün, letztes Bild jeder Reihe) durchgeführt. (B) Die in (A) erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe des Computerprogramms „BZ Analyzer“ von Keyence Microscope Europe (München, Deutschland) analysiert und quantifiziert, um die Zellen bezüglich einer zytoplasmatischen *anti-La* Färbung zu untersuchen. Dafür wurden pro Probe 150 bis 200 Zellen analysiert, anschließend der prozentuale Anteil jener Zellen bestimmt, welcher eine zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins aufwies und grafisch dargestellt. Der prozentuale Anteil an Zellen mit zytoplasmatischer La Anreicherung in Proben ohne externen Sauerstoffstressstimulus wurde als Hintergrundsignal gewertet und von den erhaltenen Ergebnissen der anderen Proben subtrahiert.

4.4.1.2 Rezeptorabhängige Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung in verschiedenen humanen Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Induktion von oxidativem Stress bei verschiedenen humanen, frisch isolierten Zellen oder etablierten Zelllinien auf die Lokalisation des La Proteins auswirkt. Dabei wurde nicht nur der Einfluss von H_2O_2 , sondern auch der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) untersucht. Im vorangegangenen Experiment konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von extrazellulärem NO, in Form von NO-Glutathion, zu einer zytoplasmatischen Anreicherung führte. Nun sollte zusätzlich analysiert werden, ob eine rezeptorabhängige Steigerung intrazellulären NO-Levels ebenfalls zu einer zytoplasmatischen Anreicherung von La führen kann. Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Idee, soll die Abbildung 33 behilflich sein.

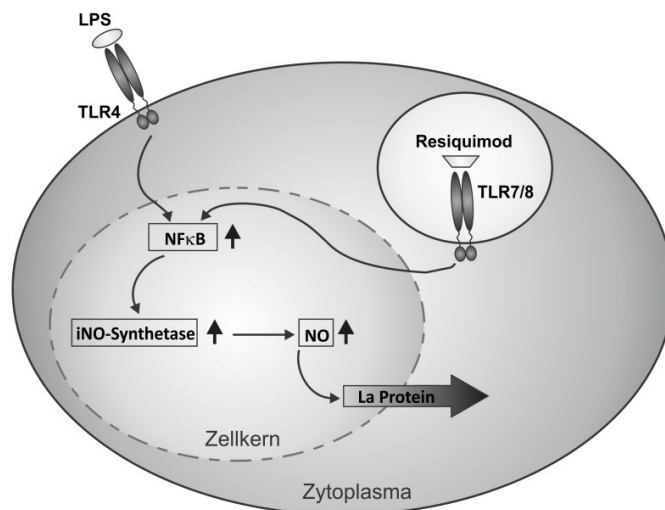


Abbildung 33: Die schematische Darstellung eines möglichen Signalweges zur Erklärung Toll-like Rezeptor (TLR) abhängiger zytoplasmatischer La Anreicherung. NO ist ein weitverbreiteter Botenstoff in der Zelle, dessen Level unter anderem durch die induzierbare NO-Synthetase (iNO-Synthetase) beeinflusst werden kann. In dendritischen Zellen (DCs) kann durch die Stimulation von TLR mit Hilfe derer Liganden der TLR-Signalweg angeschaltet werden. Im folgenden Experiment sollte dabei eine Stimulation über den TLR4 mittels Lipopolysaccharid (LPS) beziehungsweise über der TLR7/8-Agonisten Resiquimod® erfolgen [135]. Die Stimulation des TLR-Signalweges führt zu einem Anstieg von aktiven NFκB. NFκB ist ein Transkriptionsfaktor für viele verschiedenen Gene, unter anderem für die iNO-Synthetase. Ein erhöhtes Level an iNO-Synthetase führt zum Anstieg der intrazellulären NO-Menge, wodurch es zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffäquivalenten kommen kann, die zur Oxidation von La und somit zu dessen zytoplasmatischer Anreicherung in der Zelle führen könnte [141].

4.4.1.3 TLR4 abhängige zytoplasmatische La Anreicherung

Für das Experiment wurden folgende Zellen und Zelllinien verwendet. Als Negativkontrolle wurden HEK293T wt Zellen eingesetzt, die natürlicherweise keine humanen TLR exprimierten. Als Positivkontrolle wurden HEK293T Zellen verwendet, die den TLR4 nach genetischer Modifikation überexprimierten (HEK293T hTLR4). Als Vertreter von Zellen mit natürlicher TLR Expression kamen isolierte moDCs, slanDCs, sowie die B-Zelllinie „Daudi“ zum Einsatz. Um den Versuch abzurunden, wurde das Experiment auch mit der T-Zelllinie „Jurkat“ und der NK-Zelllinie „YTS“ durchgeführt. Somit konnte in diesem Experiment eine potentielle TLR-/NO-bedingte La Anreicherung von La in den wichtigsten Subpopulationen humaner PBMCs überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellt. In Abbildung 34 sind exemplarisch für dieses Experiment vier Bildtafeln der fluoreszenzmikroskopischen Analysen für die Kontrollen HEK293T wt, HEK293T hTLR4, sowie für die moDCs und die slanDCs dargestellt. Jede Bildtafel zeigt in vier Bildreihen untereinander die Ergebnisse für die unbehandelten Zellen, die Zellen nach H₂O₂, nach NO-Glutathion und nach LPS-Stimulation. Jede Bildreihe beinhaltet drei Einzelbilder einer exemplarischen Zelle aus der jeweiligen analysierten Probe. Das erste Bild zeigt die DAPI-gefärbten Zellkerne (hellblau). Das zweite Bild gibt die *anti*-La Färbung (rot) und das dritte Bild die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale wieder. Für alle vier Zellarten ließ sich dokumentieren, dass sich bei Zellen ohne zusätzlichen Stimulus das La Protein im Zellkern befand. Dies zeigten die Überlagerungsdarstellung der Zellkernfärbungen (hellblau) und der *anti*-La Färbung (rot) in den Bildern (c) der vier Bildtafeln. Eine zytoplasmatische Anreicherung von La war für alle vier Zellarten nach H₂O₂ und NO-Glutathion Stimulation zu beobachten (Bildtafeln A – D; Überlagerungsdarstellungen f und i). Unterschiede zeigten sich bei den vier Zellarten nach der Probenbehandlung in LPS-haltigem Medium. Für die HEK293T wt Zellen konnte eine Zellkernlokalisation des La Proteins dokumentiert werden (Bildtafel A; Überlagerungsdarstellung i). Die Zellarten, welche jedoch über den TLR4 verfügten, wie die HEK293T hTLR4 Zellen, moDCs und slanDCs zeigten eine zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins (Bildtafeln B – D; Überlagerungsdarstellungen i).

Für eine Verifizierung dieser auf fluoreszenzmikroskopischen Analysen beruhenden Ergebnisse, wurden die Daten im Folgenden quantifiziert. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen der Abbildung 35 abgebildet. Dabei zeigt die obere Diagrammreihe die Daten zu den in Abbildung 34 dargestellten mikroskopischen Aufnahmen. Deutlich ist diesen Diagrammen zu entnehmen, dass HEK293T wt Zellen, HEK293T hTLR Zellen und mDCs eine La Anreicherung im Zytoplasma in etwa 50 % bis 80 % der Zellen nach H₂O₂ Behandlung zeigten. Für slanDCs war nach H₂O₂ auf Grund der zu geringen Zellzahl nach der H₂O₂ Behandlung keine Quantifizierung mehr möglich.

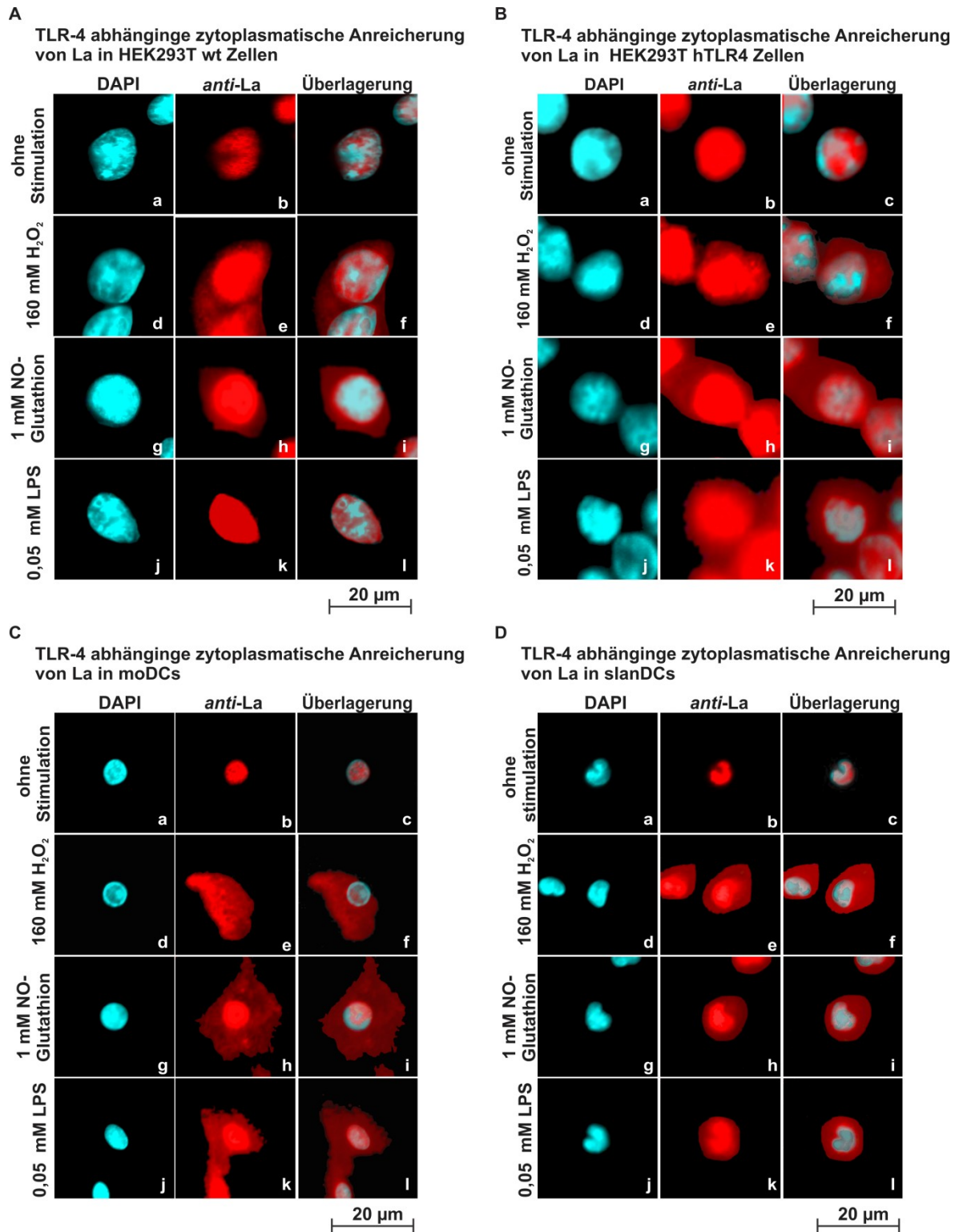


Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in verschiedenen Zelltypen nach Induktion von oxidativem Stress durch H_2O_2 , NO-Glutathion und Lipopolysaccharid (LPS). Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Studien sollte die La Lokalisation von HEK293T wt (A), HEK293T hTLR4 (B), moDCs (C) und slanDCs (D) nach 20 Minuten Stimulation mit 0,05 mM LPS analysiert werden (j-l). Zum Vergleich wurden Zellen ohne Stimulation (a - c) beziehungsweise 160 mM H_2O_2 (d - f) oder 1 mM NO-Glutathion (g-i) stimulierte Zellen betrachtet. Für jede Zellprobe wrden die Zellkerne (DAPI, hellblau) und das gefärbte La Protein (rot) für eine exemplarische Zelle gezeigt. Durch die Darstellung der Überlagerungen beider Farbsignale (c, f, i, l) jeder Zelle ließ sich die Lokalisation des La Proteins besser beurteilen.

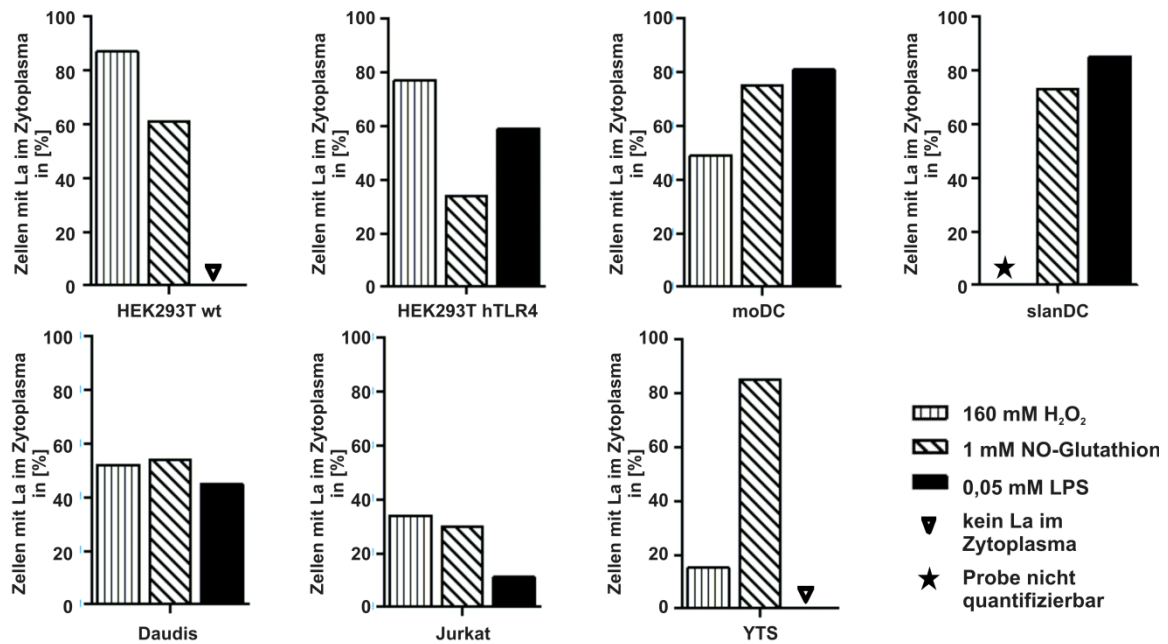


Abbildung 35: Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in verschiedenen Zelltypen nach Induktion von oxidativem Stress durch H₂O₂, NO-Glutathion und Lipopolysaccharid (LPS). Die Ergebnisse der in Abbildung 34 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Studien wurden mit Hilfe des Computerprogrammes „BZ Analyzer II“ (Keyence Microscope Europe) quantifiziert. Zusätzlich zu den in 4.4.1.2 dargestellten Zellen wurde die TLR4-abhängige zytoplasmatische La Anreicherung auch noch in Daudis (B-Zelllinie), in Jurkats (T-Zelllinie) und YTS Zellen (NK-Zelllinie) untersucht. Für jede Probe wurde der prozentuale Anteil von Zellen bestimmt, welcher eine zytoplasmatische La Anreicherung zeigte. Der prozentuale Anteil von Zellen mit La im Zytoplasma, welcher in Zellen ohne Stimulation von oxidativen Stress beobachtet wurde, wurde als Hintergrundsignal gewertet. Solch ein Hintergrundsignal lag zwischen 0 % für HEK293T Zellen und etwa 20 % bei DCs und war von der allgemeinen Empfindlichkeit der Zellen abhängig. Das ermittelte Hintergrundsignal jeder Zelllinie wurde von den Ergebnissen nach 160 mM H₂O₂ Stimulation (längsgestreift), 1 mM NO-Glutathion Stimulation (diagonalgestreift) und 0,05 mM LPS Stimulation (schwarz) abgezogen und die Ergebnisse grafisch dargestellt. Proben, die ausschließlich eine Zellkernlokalisation von La zeigten, wurden durch ein Dreieck (▽) gekennzeichnet. slanDCs, welche mit 160 mM H₂O₂ behandelt wurden, zeigten auf Grund der Behandlung in ihrer Zellzahl eine starke Dezimierung, sodass nur wenige exemplarische Zellen dokumentiert werden konnten, jedoch keine Quantifizierung mehr möglich war (★).

Für die NO-Glutathion Stimulation stellte sich heraus, dass alle vier Zellarten eine zytoplasmatische La Anreicherung zeigten. Sie lag zwischen etwa 35 % bei den HEK293T hTLR Zellen, 60 % bei HEK293T wt Zellen, sowie bei knapp 80 % bei den beiden DC Subklassen. Die Quantifizierung der LPS-stimulierten Proben zeigte bei etwa 60 % der HEK293T hTLR4 Zellen und zirka 80 % der moDCs und slanDCs eine Anreicherung vom La im Zytoplasma. In der unteren Diagrammreihe sind die Ergebnisse für die B-, T- und NK-Zelllinien dargestellt. Dabei zeigte sich für die Daudi Zellen, dass alle drei untersuchten Stimuli zu einer zytoplasmatischen La Anreicherung in etwa 50 % der Zellen führte. Für die T-Zelllinie Jurkat wurde eine geringere La Anreicherung im

Zytoplasma beobachtet. Sie lag bei etwa 30 % im Falle einer H₂O₂ oder NO-Glutathion Stimulation und zirka 10 % nach LPS Stimulation. Deutliche Unterschiede bezüglich des Stimulus gab es bei der Analyse der NK-Zelllinie YTS. War nach einer NO-Glutathion Behandlung noch eine deutliche La Protein Anreicherung im Zytoplasma in 80 % der YTS Zellen zu beobachten, so war eine solche nach der H₂O₂ Behandlung nur noch bei etwa 15 % der Zellen zu erkennen. Eine Inkubation in LPS-haltigem Medium führte bei YTS Zellen hingegen zu keiner veränderten La Protein Lokalisation. Nach LPS Stimulation war das La Protein ausschließlich im Zellkern der YTS Zellen zu beobachten.

Mit den hier beschriebenen Ergebnissen konnte erstmals gezeigt werden, dass es in TLR4 positiven Zellen zu einer zytoplasmatischen La Anreicherung nach LPS Stimulation kommt.

4.4.1.4 TLR7/8 abhängige zytoplasmatische La Anreicherung

In einem weiteren Experiment sollte die Hypothese der TLR abhängigen, zytoplasmatischen La Anreicherung mit Hilfe einer TLR7/8 Stimulation überprüft werden [135]. Dafür wurde der TLR7/8 Antagonist Resiquimod® (0,2 mM) verwendet. Das Experiment wurde für HEK293T wt Zellen, HEK293T hTLR4 Zellen, moDCs und slanDCs durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 36 dargestellt.

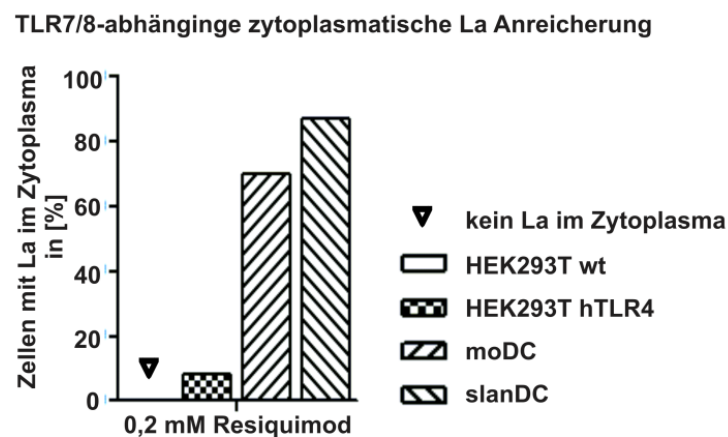


Abbildung 36: Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in verschiedenen Zelltypen nach Induktion von oxidativem Stress durch Resiquimod®. Quantifizierung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen von HEK293T wt, HEK293T hTLR4, moDCs und slanDCs nach Stimulation mit dem TLR7/8 Agonisten Resiquimod® (0,2 mM). Für jede Probe wurde der prozentuale Anteil von Zellen bestimmt, welcher eine zytoplasmatische La Anreicherung zeigte. Der prozentuale Anteil von Zellen mit La im Zytoplasma, welcher in Zellen ohne Stimulation von oxidativen Stress beobachtet wurde, wurde als Hintergrundsignal gewertet. Solch ein Hintergrundsignal lag zwischen 0 % für HEK293T Zellen und etwa 20 % bei DCs und war von der allgemeinen Empfindlichkeit der Zellen abhängig. Das ermittelte Hintergrundsignal jeder Zelllinie wurde von den Ergebnissen der Resiquimod®-Stimulation abgezogen und die Ergebnisse grafisch dargestellt. Proben, die ausschließlich eine Zellkernlokalisation von La zeigten, wurden durch ein Dreieck (▽) gekennzeichnet.

Das Experiment zeigte, dass es zu keinerlei zytoplasmatischen La Proteins in HEK293T wt Zellen kam. Die HEK293T hTR4 Zellen wiesen bei knapp 10 % der Zellen ein zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins auf, was auf eine eventuelle Kreuzreaktion über den überexprimierten TLR4 zurückzuführen ist. Anders verhielt es sich bei den beiden Subpopulationen der dendritischen Zellen. In etwa 70 % der moDCs und in fast 90 % der slanDCs konnte durch TLR7/8 Stimulation mit Resiquimod® eine Anreicherung des La Proteins im Zytoplasma der Zellen induziert werden.

Dieser Sachverhalt konnte so erstmals für das La Protein in dendritischen Zellen gezeigt werden und stützt die anfangs formulierte Idee der TLR abhängigen zytoplasmatischen La Anreicherung.

4.4.1.5 Rezeptorabhängige Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung in Endothelzellen

Als eine Art Sonderfall fielen bei den Versuchen zur TLR abhängigen, zytoplasmatischen La Anreicherung die Endothelzellen (HUVECs) auf. Daher sollen die entsprechenden Ergebnisse hier noch einmal gesondert betrachtet werden.

Zunächst zeigten HUVECs unabhängig vom Stimulus ausschließlich eine Zellkern-lokalisierung für das La Protein, siehe Abbildung 37 (A) und (C) oberes Diagramm. Auf Grund von Versuchen von Odin *et al.* (2001) [142] entstand die Idee, auch in den hier durchzuführenden Stimulationsversuchen eine Buthioninsulfoximin (BSO) Inkubation vorzuschalten, um die Sensitivität gegenüber Sauerstoffstress zu steigern. Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente sind in Abbildung 37 (B) und im unteren Diagramm von (C) dargestellt. Die Analysen zeigten, dass es, nachdem die Sensitivität gegenüber Sauerstoffstress durch 24 stündige Kultivierung der HUVECs in BSO-haltigem Medium vor Versuchsbeginn gesteigert wurde, zu einer deutlichen zytoplasmatischen La Anreicherung in diesen Zellen kam. Dabei war die Art der Stimulation weniger von Bedeutung. Durch H₂O₂ Behandlung wurden etwa 80 % der Zellen angeregt La im Zytoplasma anzureichern. Die Cu(II)SO₄ und Fe(II)Cl₂ Stimulationen führten in 70 % beziehungsweise 90 % der Zellen zu einer zytoplasmatischen La Anreicherung. In 70 % der HUVECs war nach NO-Glutathion Stimulation das La Protein im Zytoplasma lokalisiert und in 60 % der Zellen nach LPS Stimulation.

Mit diesen Ergebnis konnte erstmals gezeigt werden, dass auch in Endothelzellen eine Sauerstoffstress bedingte und TLR4 abhängige, zytoplasmatische La Anreicherung induziert werden kann, wenn zuvor die Sensitivität der Zellen gegenüber Sauerstoffstress erhöht wurde.

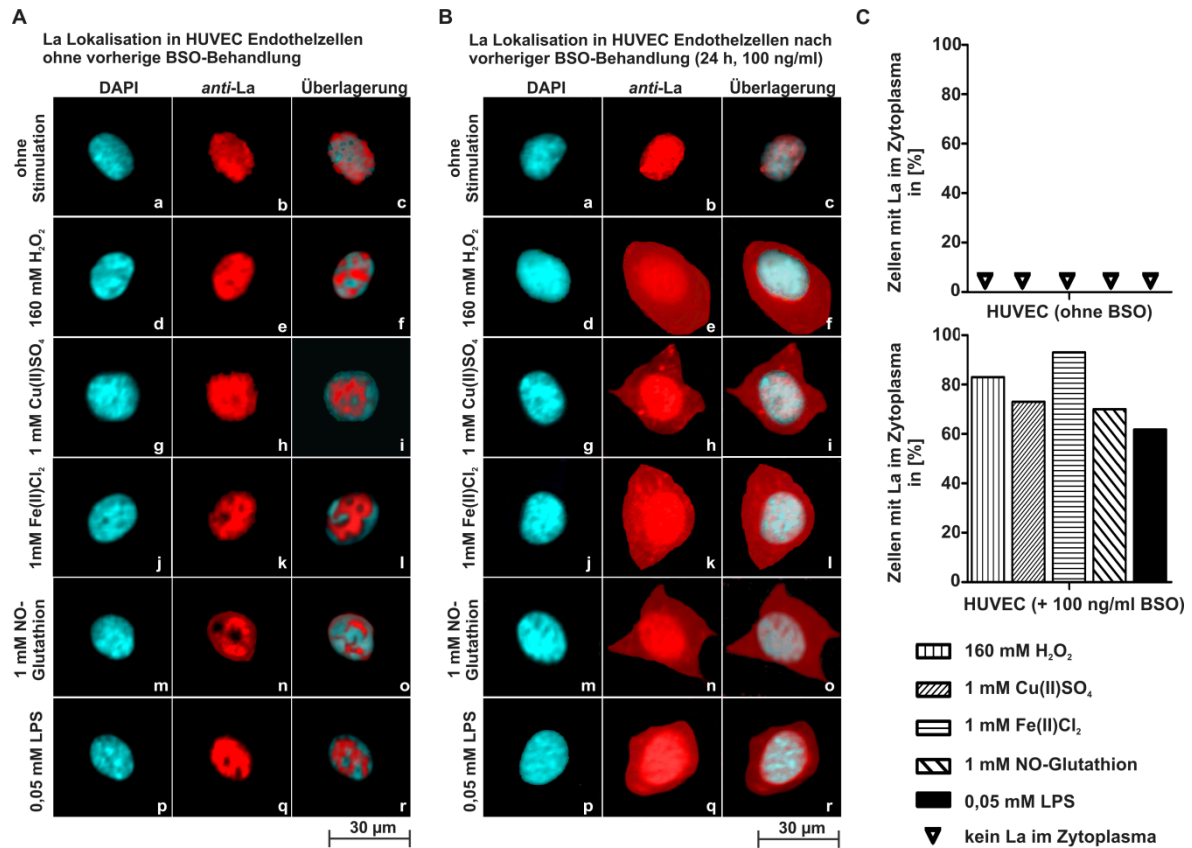


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Studien und deren Quantifizierung zur zytoplasmatischen La Anreicherung in HUVECs nach Induktion von oxidativem Stress durch verschiedene Stimuli. (A) Bildtafel mit den Darstellungen einzelner exemplarischer Zellen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen. Die hier dargestellten Zellen wurden vor dem Experiment in Medium ohne BSO kultiviert. In Bildtafel (B) sind die Resultate der äquivalenten Versuche mit Zellen nach vorangegangener BSO-Behandlung gezeigt. Beide Bildtafeln bestehen aus mehreren untereinander angeordneten Bildreihen und zeigen die Ergebnisse der verschiedenen Stimuli, wobei die obere Reihe die Resultate unbehandelter Zellen wiedergibt. Jede Bildreihe besteht aus drei Einzelaufnahmen: die DAPI-Kernfärbungen (hellblau, erstes Bild), die *anti-La* Färbung (rot, zweites), sowie die Überlagerung beider Signale (drittes Bild). Die Quantifizierung der ermittelten Daten ist in (C) dargestellt. Dabei ist im oberen Diagramm die Quantifizierung der Ergebnisse ohne BSO-Behandlung und im unteren Diagramm die Quantifizierung der Proben nach BSO-Behandlung zu sehen. Das ermittelte Hintergrundsignal aus den Proben „ohne Stimulus“ wurde von den Ergebnissen der verschiedenen Stimulationenarten abgezogen und die Ergebnisse grafisch dargestellt. Proben, die ausschließlich eine Zellkernlokalisation von La zeigten, wurden mit einem Dreieck (▽) gekennzeichnet.

Alle Untersuchungen bezüglich der Induktion von Sauerstoffstress in Zellen zeigten eine zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins. Die war für mehrere verschiedene Zelltypen dokumentierbar. Neben der sauerstoffstressinduzierten La Anreicherung im Zytoplasma durch unspezifische Stimuli (H₂O₂, Cu(II)SO₄, Fe(II)Cl₂ und NO-Glutathion), welche ansatzweise schon von C. Franke [109] dokumentiert wurde, konnte erstmals die rezeptorabhängige Induktion gezeigt werden. Dabei stand die Stimulation der zytoplasmatische La Anreicherung über TLR in dendritischen Zellen und Endothelzellen im Vordergrund.

4.4.2 Das La Protein und seine Translokation auf die Zelloberfläche

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der La Proteintranslokation auf die Zelloberfläche. In der Literatur wurde dieser Prozess bisher sehr kontrovers diskutiert. Eine Zugänglichkeit von La Protein auf der Oberfläche lebender Zellen wäre jedoch durchaus relevant für Patienten mit Autoantikörpern gegen La und der Entwicklung von Krankheitsschüben. Eventuell wären diese Autoantikörper dann sogar als pathophysiologisch relevant zu betrachten.

Mit den folgenden Experimenten sollte nun analysiert werden, unter welchen Umständen es zur Präsentation von La auf der Zelloberfläche kommt und inwiefern es dabei Unterschiede zwischen oxidiertem und reduziertem La Protein gibt. Bei den bisherigen Studien, wie sie in dem Abschnitt 4.4.1 durchgeführt wurden, war keine Translokation auf die Zelloberfläche, bedingt durch die Induktion von Sauerstoffstress, zu beobachten.

4.4.2.1 Bindung von rekombinanten La Protein auf murinen A9 Zellen

Um als erstes die generelle Bindung von La Protein auf die Oberfläche von lebenden Zellen zu prüfen, wurden murine Zellen mit dem humanen, rekombinant produzierten La wt beziehungsweise der Tripelcysteinmutante inkubiert. Die Resultate dieses Experiments sind in Abbildung 38 dargestellt. In der Grafik (A) der Abbildung 38 sind die Histogramme einer Durchflusszytometeranalyse zu sehen, die nach der Dekoration der murinen A9 Zellen mit 10 µg (22 µM) La wt (links) und La_{C18A_C232A_C245A} (rechts) erzielt wurden. Die Hintergrundsignale, welche durch die *anti*-La Färbung undekorierte Zellen hervorgerufen wurde, sind als weiße *Peaks* in den Histogrammen zu sehen. Die Signale der eigentlichen *anti*-La Messung wurden schwarz dargestellt. Aus beiden Histogrammen ist zu entnehmen, dass es durch die *anti*-La Färbung La dekorierte Zellen zu einer Verschiebung der *Peaks* im Vergleich zum Hintergrundsignal kam. Dies konnte als positives Messsignal gewertet werden und war gleichzusetzen mit dem Nachweis der rekombinanten La Proteine auf der Oberfläche muriner A9 Zellen. Die beiden Proben unterschieden sich lediglich in der Menge des oberflächengebundenen Proteins, was sich in den unterschiedlichen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) äußerte. Die La wt Probe wies eine deutlich höhere MFI auf als die Tripelcysteinmutante. So hätte an dieser Stelle des Experiments vermuten werden können, dass La_{C18A_C232A_C245A} schlechter an die Zelloberfläche bindet als das oxidierbare Wildtypprotein. Um die Frage der Bindeeigenschaften der beiden Proteine zu verifizieren, sollten Bindekurven für diese aufgezeichnet werden und die Affinitäten mittels der Bestimmung der Assoziations-/Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) analysiert werden. Die erhaltenen Bindekurven inklusive der K_D -Werte sind in Abbildung 38 (B) zu sehen.

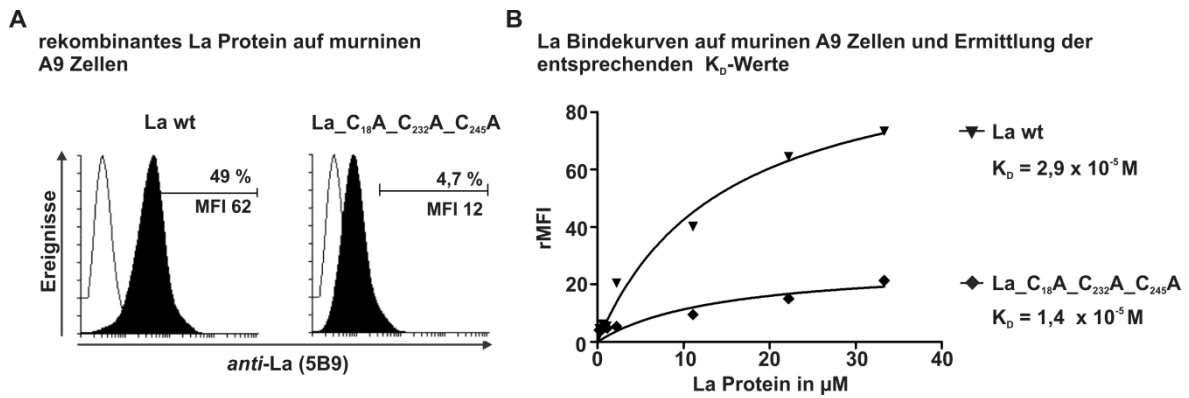


Abbildung 38: Bindung von rekombinantem La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A} auf murinen A9 Zellen. (A) Histogramm einer durchflusszytometrischen Analyse von murinen A9 Zellen nach einstündiger Dekoration mit 22 μM rekombinanten La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A} bei 37 °C. Der Nachweis der La Proteine erfolgte mittels 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-La (5B9) und einem goat anti-mouse-IgG-PE Antikörper (1:400) und wurden in der Grafik schwarz dargestellt. Parallel wurden unbehandelte A9 Zellen als Negativkontrolle auf oberflächen-gebundenes La Protein gefärbt (weiß). (B) Bindungskurven von La wt und La_{C18A_C232A_C245A} auf murinen A9 Fibroblasten inklusiver der ermittelten K_D -Werte: Für die Bestimmung der Affinität der beiden La Proteine auf die Zelloberflächen wurden A9 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (0,2; 1,1; 2,2; 11; 22 und 33 μM) von La beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A} für 1 h bei 37 °C inkubiert bevor der Nachweis mit Hilfe von 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-La (5B9) und goat anti-mouse-IgG-PE Antikörper (1:400) durchflusszytometrisch erfolgte. Die im FACS Calibur ermittelten MFI-Werte wurden nach Abzug des MFIs undekoriierter Zellen als sogenannter relativer MFI (rMFI) gegen die eingesetzte La Proteinkonzentration grafisch aufgetragen. Mit Hilfe des Programms „GraphPadPrism“ wurden die „Specific Binding - One Side“-Bindekurven und die K_D -Werte ermittelt.

Für beide La Proteine wurden zwei unterschiedliche Kurven aufgezeichnet. Für La wt wurde eine Kurve bestimmt, deren maximale relative mittlere Fluoreszenzintensität (rMFI) um etwa den Faktor 3 höher war als für La_{C18A_C232A_C245A}. Das heißt, dass nach der Zelldekoration mit 33 mM La wt zirka dreimal mehr Moleküle auf den Zellen gebunden vorlagen als bei der vergleichbaren Dekoration mit der Tripelcysteinmutante. Die K_D -Werte wiesen jedoch die gleiche Größenordnung von 10^{-5} auf, was auf eine vergleichbare Affinität schließen ließ. Die Daten bedeuten, oxidiertes und reduziertes La Protein binden gleich gut an die Oberfläche von A9 Zellen, jedoch sind für das oxidierte La Protein scheinbar mehr Bindestellen vorhanden als für die reduzierte Konformation. Alternativ könnte der höhere Anteil gebundenen La wt Proteins auf den Zellen auch mit der Bindung von La Di- und Oligomeren erklärt werden.

4.4.2.2 Bindung von rekombinantem La Protein auf verschiedenen humanen Zellen

Nachdem die Bindung von La wt und La_{C18A_C232A_C245A} eindeutig auf murinen Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun geprüft werden, wie es sich mit der La Bindung auf humanen Zelltypen verhält. Dafür wurde die Bindung zum einen auf isolierten T-Zellen,

Endothelzellen (HUVEC) und Monozyten überprüft. Parallel wurden auch Zelllinien wie Jurkat, Radji und YTS Zellen auf ihr La Bindevermögen untersucht. Die Resultate sind der Abbildung 39 zu entnehmen. Aus dem Versuch konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: Die bestimmten K_D -Werte für La wt lagen im Größenordnungsbereich von 10^{-5} (YTS und Endothelzellen) bis 10^{-6} (Monozyten, Radji, Jurkat und T-Zellen). Die ermittelten K_D -Werte für die Tripelcysteinmutante waren vergleichbar mit Größenordnungen von 10^{-4} (Endothelzellen) bis 10^{-5} (Monozyten, Radji, T-Zellen und YTS Zellen) und 10^{-6} (Jurkat).

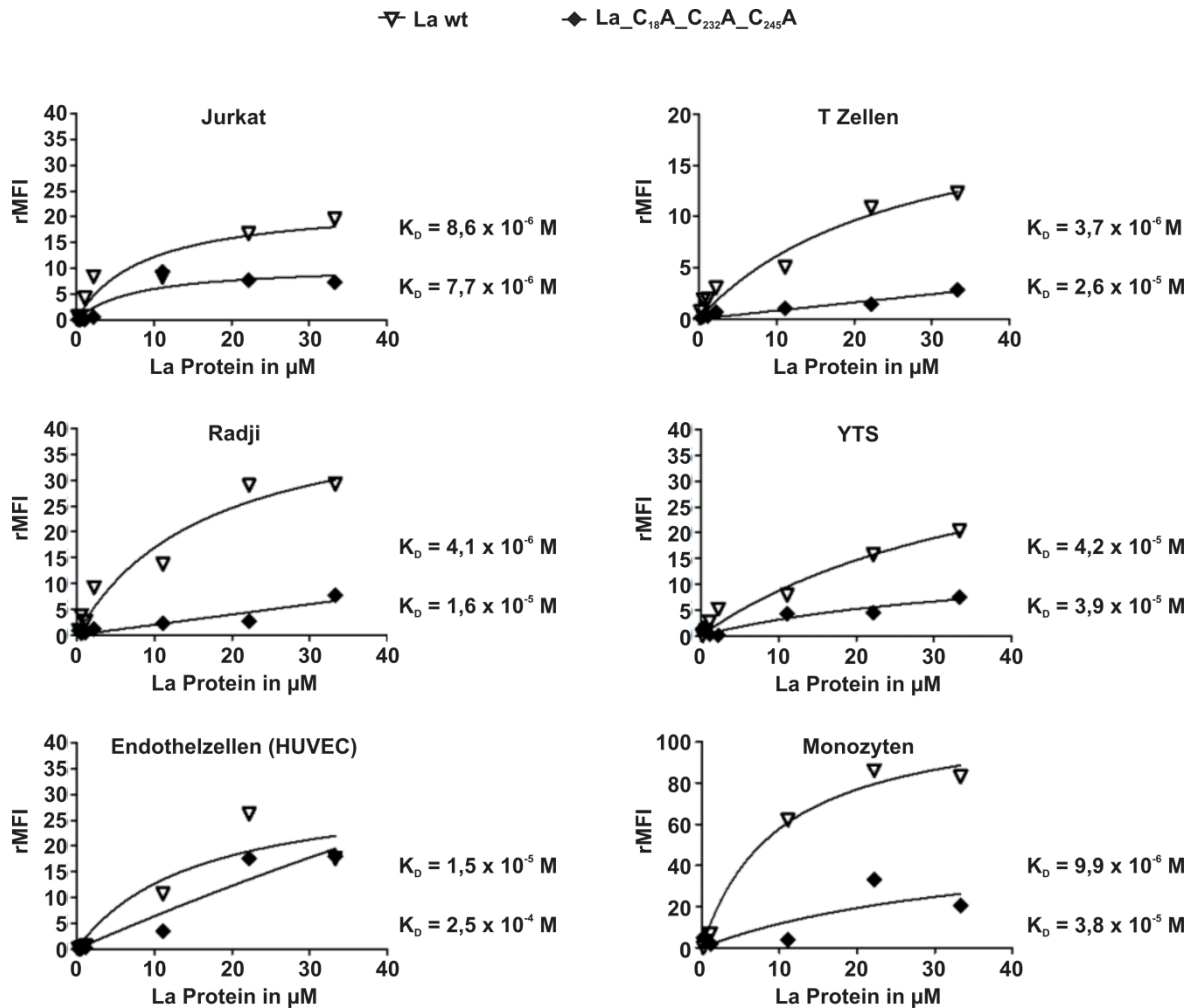


Abbildung 39: Die Bindung von rekombantem La wt beziehungsweise La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A auf verschiedenen Zellen. Wie auf murinen A9 sollten in diesem Versuch die Bindegeseigenschaften von La wt und La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A auf verschiedenen humanen Zellen getestet werden. Dabei wurde die Bindung auf isolierten T-Zellen, Endothelzellen und Monozyten analysiert, sowie auf Jurkats (T-Zelllinie), Radjis (B-Zelllinie) und YTS-Zellen (NK-Zelllinie). Für die Bestimmung der Affinität der beiden La Proteine auf Zellen wurden diese La Proteine in verschiedenen Konzentrationen (0,2; 1,1; 2,2; 11; 22 und 33 µM) für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor der Nachweis mit Hilfe von 5 µg/ml *anti-La* (5B9) und *goat anti-mouse-IgG-PE* Antikörper (1:400) durchflusszytometrisch erfolgte. Die im FACS Calibur ermittelten MFI-Werte wurden nach Abzug des MFIs undekorierter Zellen als sogenannter relativer MFI (rMFI) gegen die eingesetzte La Proteinkonzentration grafisch aufgetragen. Mit Hilfe des Programms „GraphPadPrism“ wurden die „Specific Binding - One Side“-Bindekurven und die K_D -Werte ermittelt.

Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden La Proteine vergleichbare Affinitäten zu den Oberflächen dieser humanen Zellen aufwiesen, ähnlich wie zu den murinen A9 Zellen aus dem vorhergehenden Versuch. Ebenso konnte in diesem Versuch nochmals gezeigt werden, dass alle Zelltypen scheinbar mehr gebundenes La wt als permanent reduziertes La, in Form der Tripelcysteinmutante, aufweisen. Wie im Fall der murinen A9 Zellen, konnten auch hier höhere maximale rMFI Werte für La wt als für La_{C18A_C232A_C245A} bestimmt werden. Diese Unterschiede könnten wieder auf eine unterschiedliche Anzahl von Bindestellen für oxidiertes oder reduziertes La Protein zurückzuführen sein, oder auf eine Assoziation von Di- und Oligomeren von La wt. Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen waren ebenfalls zu beobachten, vor allem in der Betrachtung der maximalen rMFIs für La wt. Es zeigte sich, dass für Monozyten die höchste maximale rMFI (etwa 80) ermittelt werden konnte. Damit wiesen Monozyten die größte Menge von gebundenem La Protein innerhalb der analysierten Zelltypen auf. Den Monozyten folgten in diesem Zusammenhang die B-Zelllinie (Radji) und die Endothelzellen (HUVEC) mit einer maximalen rMFI von rund 30. Daran schlossen sich die T-Zelllinie (Jurkat) und die NK-Zelllinie (YTS) mit einer maximalen rMFI von etwa 20 an. Die geringste maximale rMFI für La wt wurde für die isolierten T-Zellen ermittelt (rund 15), was gleichbedeutend mit der geringsten Menge von gebundenen La Protein auf deren Zelloberfläche ist.

So lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass für La wt und die Tripelcysteinmutante ähnliche Affinitäten zu den Oberflächen der verschiedenen PBMC Subpopulationen und Endothelzellen bestimmt werden konnten. Jedoch wurden ebenso Unterschiede in der Oberflächenassoziation von La durch die verschiedenen Zelltypen verzeichnet. Dabei zeigten Zellen wie Monozyten und B-Zellen (Radji), als Vertreter der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), sowie die Endothelzellen eine eher große Mengen an gebundenem La Protein, beziehungsweise die höchste Anzahl von La Bindestellen. T-Zellen und NK-Zellen wiesen eine niedrigere Anzahl von La Bindestellen auf und ließen sich daher nur schwer mit La Protein dekorieren.

4.4.2.3 Durchflusszytometrische Studie zur La Proteinbindung auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit lebenden, apoptotischen oder nekrotischen humanen HeLa Zellen

Bisher konnte gezeigt werden, dass rekombinantes La wt und La_{C18A_C232A_C245A} auf die Oberfläche lebender Zellen binden kann. Nun sollte überprüft werden, ob sterbende Zelle *in vivo* als potentielle La Quelle in Frage kommen würden. Denn bisher ist es sehr umstritten, wie eine Exposition von La auf der Oberfläche lebender Zellen möglich ist. Für diesen Versuch wurden murine A9 Zellen mit apoptotischen und nekrotischen HeLa Zellen kokultiviert. Auf diese Weise sollte geprüft werden, durch welche Form des Zelltods

mehr La Protein freigesetzt wird, das im Anschluss wiederum auf lebende Nachbarzellen binden kann. Die Apoptose bei den verwendeten HeLa Zellen wurde durch Bestrahlung mit 50 Gy Gamma-Strahlung induziert. Nekrotisches Zellmaterial wurde durch die sechsstündige Inkubation von HeLa Zellen bei 42 °C im Wasserbad gewonnen. Als Kontrollen wurden in diesem Versuch Proben mitgeführt, in denen die murinen A9 Zellen entweder mit La wt oder der Tripelcysteinmutante dekoriert, beziehungsweise mit lebenden HeLa Zellen kokultiviert wurden. Anschließend wurden die A9 Zellen gegen La Protein gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Resultate des Versuches sind in Abbildung 40 und Abbildung 41 zu sehen.

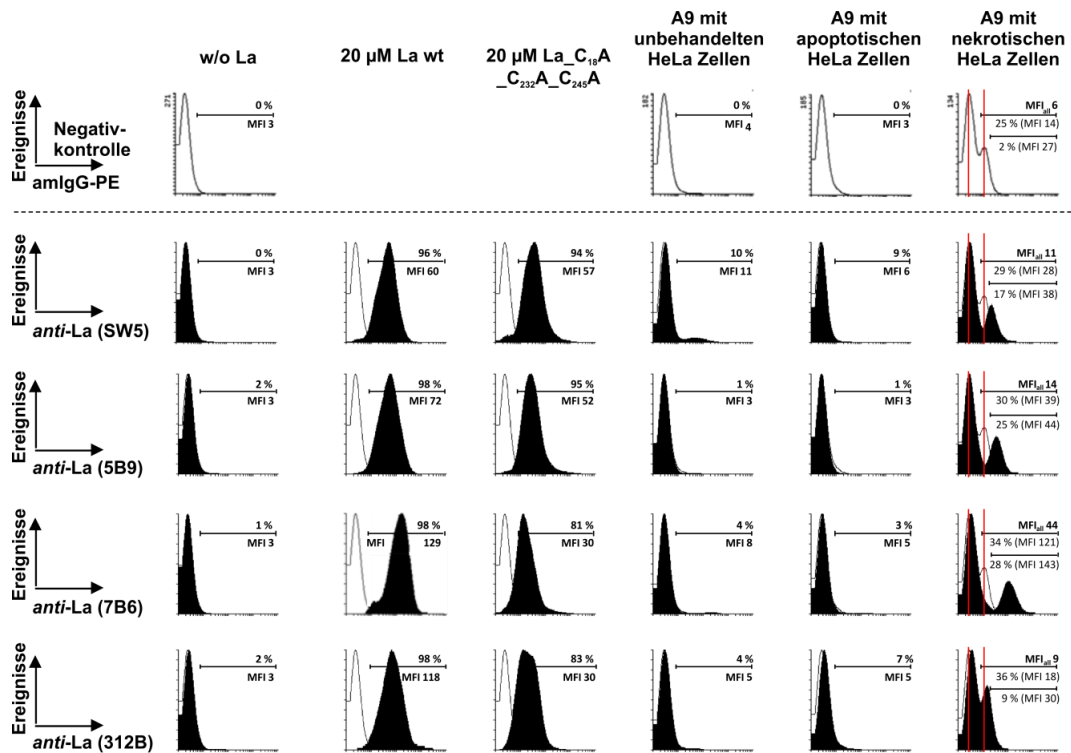


Abbildung 40: Die Bindung von humanem La Protein auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit humanen unbehandelten, apoptotischen oder nekrotischen HeLa Zellen. Die dargestellten Histogramme zeigen die *anti-La* Färbung auf murinen eFluor670[®] positiven A9 Zellen gegen La Protein. Dafür wurden für die Positivkontrollen rekombinantes La Protein (20 µM La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A}) verwendet. Für die Kokultivierung wurden lebende HeLa, apoptotische HeLa (50 Gy bestrahlt) oder nekrotische HeLa Zellen (6 h bei 42 °C inkubiert) verwendet. Für die *anti-La* Färbung auf den eFluor670[®] positiven A9 Fibroblasten kamen folgende *anti-La* Antikörper mit einer Konzentration von 5 µg/ml zum Einsatz: SW5, 5B9, 7B6 und 312B. Als Sekundärantikörper wurden ein *goat anti-mouse-IgG-PE* (1:400) genutzt, die Proben wurden abschließend durchflusszytometrisch analysiert und grafisch in Histogrammen (schwarz) dargestellt. Als Negativkontrollen wurden A9 Zellen allein, beziehungsweise A9 Zellen nach Kokultivierung mit lebenden, apoptotische oder nekrotischen HeLa Zellen ausschließlich mit dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse-IgG-PE* (1:400) gefärbt. Die somit ermittelten Hintergrundsignale sind in der oberen Histogrammreihe in weiß dargestellt. Für alle Proben wurde außerdem der prozentuale Anteil La Protein positiver Zellen ermittelt und der MFI über alle Zellen der *anti-La* Färbung angegeben. Je höher der MFI, desto mehr La ist auf den Zellen gebunden. Die Proben von A9 Zellen, welche mit nekrotischen HeLa Zellen kokultiviert wurden, zeigten außerdem einen zweiten Peak im Histogramm. Auch für diesen wurde der prozentuale Anteil und der MFI ermittelt.

In der ersten der beiden Abbildungen sind die Histogramme der verschiedenen *anti-La* Färbungen auf den A9 Zellen dargestellt. Hierfür wurde von jeder Behandlungsmethode ein exemplarisches Beispiel der durchgeführten Dreifachbestimmung ausgewählt. In der Diagrammtafel sind nebeneinander die verschiedenen Behandlungsmethoden, La wt und La_{C18A}C_{232A}C_{245A} Dekoration, sowie die Kokultivierungen mit lebenden, apoptotischen und nekrotischem Zellmaterial dargestellt. Untereinander zeigt die Bildtafel die einzelnen Histogramme der verschiedenen *anti-La* Färbungen, dabei sind in der obersten Bildreihe die Hintergrundsignale (weiße *Peaks*) dargestellt, welche mit den Negativkontrollen ermittelt werden konnten. Anschließend folgen in den unteren Bildreihen die Resultate der *anti-La* Färbungen mit dem *anti-La* mAK SW5, 5B9, 7B6 und 312B (schwarze *Peaks*). Mit Hilfe der gewonnenen Daten, erschloss sich aus diesem Kokultivierungsversuch folgendes Bild. Murine A9 Zellen allein (erste Spalte der Bildtafel), trugen auf ihrer Oberfläche kein La Protein. Auf Grund der verwendeten *anti-La* mAK konnte diese sowohl für humanes La Protein (SW5, 7B6) als auch für murines La Protein (5B9) eindeutig belegt werden. Mit Hilfe der Positivkontrollen, in den Spalten zwei und drei der Bildtafel, konnte wiederholt gezeigt werden, dass sich die murinen A9 Zellen mit dem rekombinanten, humanen La Proteinen La wt und La_{C18A}C_{232A}C_{245A} dekorieren lassen. Das zeigte sich in einer deutlichen Verschiebung der schwarzen *Peaks* im Vergleich zu den Negativkontrollen, dargestellt als weiße *Peaks*, sowie den ermittelten MFIs und dem prozentualen Anteil der Zellen mit positivem *anti-La* Signal. Neu in diesem Versuch waren die Resultate nach den Kokultivierungen mit den verschiedenen HeLa Zellen. Die Spalte vier der Bildtafel zeigt die *anti-La* Färbungen der A9 Zellen nach Kokultivierung mit den lebenden HeLa Zellen. Hierbei wurde deutlich, dass es zu keiner Signalverschiebung in den Histogrammen kam. Das bedeutet, während der Inkubation von murinen A9 Zellen mit lebenden humanen Zellen wurde kein humanes La Protein frei gesetzt. So war im Anschluss auch kein humanes La Protein auf den A9 Zellen detektierbar. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach der Kokultivierung der murinen A9 Zellen mit apoptotischen Zellen, wie in der Spalte fünf der Bildtafel dargestellt.

Interessant war die *anti-La* Färbung der murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit nekrotischem, humanem Zellmaterial, erkennbar in der letzten Spalte der Bildtafel. Bereits bei der Negativkontrolle, ergab sich eine zusätzliche Schulter im ermittelten Histogramm der Probe. Die unspezifische Bindung der Nachweisantikörper, welche darin zu erkennen ist, geht vermutlich auf die Assoziation von nekrotischem Zellmaterial an die Zelloberfläche der A9 Zellen zurück. Bei den Proben mit einer *anti-La* Färbung wurde, im Vergleich zu allem bisher Betrachteten, ein zweites Signal in Form eines zusätzlichen *Peaks* sichtbar. Die MFIs dieser Signale unterschieden sich je nach verwendete *anti-*

La mAK. Bei der Färbung mit dem 312B ähnelt dieses Signal eher der in der Negativkontrolle bestimmten Schulter. In den Proben, welche mit dem SW5 oder dem 5B9 gefärbt wurden, war das Signal schon als deutlicher einzelner *Peak* im Histogramm erkennbar, welcher eine klare Verschiebung gegenüber der Schulter aus dem Histogramm der Negativkontrolle zeigte. Die höchste gemessene Signalintensität zeichnete sich in der Probe mit der 7B6 Färbung ab. Mit Hilfe dieser Daten konnte gezeigt werden, dass nach der Kokultivierung mit nekrotischem Zellmaterial bei den A9 Zellen zwei Subpopulationen entstehen. Eine Subpopulation, dargestellt durch den ersten *Peak* in den Histogrammen, zeigt kein La Protein auf der Zelloberfläche. Die zweite Subpopulation, repräsentiert durch den zweiten Peak der Histogramme, zeigte deutlich La Protein auf ihrer Zelloberfläche. Dieses La Protein, war jedoch nur mit den *anti*-La mAK 5B9 und 7B6 wirklich nachweisbar. Der Umstand, dass kein eindeutiges positives Signal mit Hilfe des 312B zu bestimmen war, ließ darauf schließen, dass das oberflächen-gebundene La Protein nicht in der reduzierten Konformation vorliegt, sondern eher oxidiert. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die ermittelte MFI nach der 7B6 Färbung am höchsten ist. Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden durch die Quantifizierung der Dreifachbestimmungen dieses Experiments sowie deren statischen Bewertung nochmals besonders deutlich, siehe Abbildung 41.

Mit der statistischen Auswertung des vorliegenden Versuches konnte gezeigt werden, dass auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit nekrotischen HeLa Zellen signifikant mehr La Protein auf der Zelloberfläche vorhanden war als nach Kokultivierung mit lebenden oder apoptotischen Zellen. Dies galt vor allem für die Proben, welche mit dem *anti*-La mAK 5B9 und 7B6 gefärbt wurden. Außerdem war die ermittelte rMFI der 7B6 gefärbten Proben von A9 Zellen nach Kokultivierung mit nekrotischem HeLa Zellen signifikant höher als bei den *anti*-La Färbungen mit einem der anderen Antikörper. Das sprach für die oxidierte Konformation des gebundenen La Proteins, inklusive einer verbesserten Zugänglichkeit des 7B6-Epitops.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen, totes Zellmaterial konnte als Quelle für La Protein dienen, welches sich anschließend auf der Oberfläche von lebenden Nachbarzellen wiederfand. Dabei war jedoch entscheidend, dass die La Donorzellen durch Nekrose zerstört wurden. Durch Apoptose zu Grunde gegangene Zellen konnten nicht zu einer Dekoration von lebenden Nachbarzellen mit La Protein beitragen. Fand eine Dekoration von lebenden Zellen mit La Protein aus nekrotischen Zellen statt, so lag dieses anschließend scheinbar in oxidiert Konformation vor.

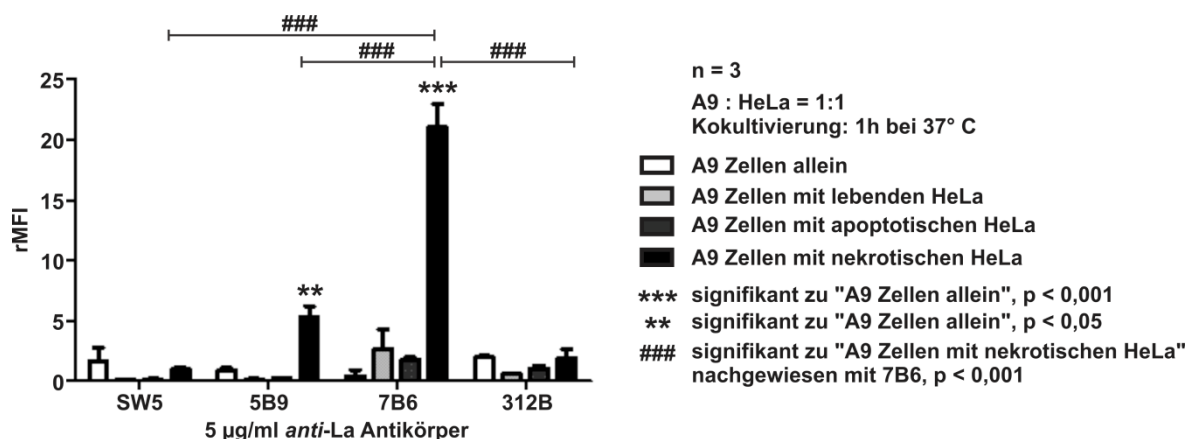


Abbildung 41: Quantifizierung von humanem La Protein auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit humanen unbehandelten, apoptotischen oder nekrotischen HeLa Zellen.

Die Grafik zeigt die mit dem FACS Calibur bestimmten relativen MFIs einer *anti*-La Färbung auf murinen eFluor670[®] positiven A9 Zellen. Dabei wurden vier verschiedene Proben als Dreifachbestimmung miteinander verglichen: A9 Zellen alleine (weiß), A9 Zellen kokultiviert mit lebenden HeLa Zellen (hellgrau), A9 Zellen kokultiviert mit apoptotische HeLa Zellen (50 Gy bestrahlt; dunkelgrau) und A9 Zellen kokultiviert nekrotische HeLa Zellen (6 h bei 42 °C inkubiert; schwarz). Für die *anti*-La Färbung auf den eFluor670[®] positiven A9 Fibroblasten kamen folgende *anti*-La Antikörper mit einer Konzentration von 5 µg/ml zum Einsatz: SW5, 5B9, 7B6 und 312B. Als Sekundärantikörper wurden ein *goat anti-mouse*-IgG-PE (1:400) genutzt. Als Negativkontrollen wurden A9 Zellen alleine, beziehungsweise A9 Zellen nach Kokultivierung mit lebenden, apoptotische oder nekrotischen HeLa Zellen ausschließlich mit dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse*-IgG-PE (1:400) gefärbt. Die somit ermittelten MFI-Hintergrundsignale wurden von den MFIs der einzelnen Proben abgezogen, woraus sich die relative MFI (rMFI) ergab. Die rMFIs der Triplets der Proben wurden abschließend gemittelt, die Standardabweichung bestimmt und grafisch dargestellt. Die statistische Analyse innerhalb der Betrachtung mit einem *anti*-La Antikörper erfolgte mit einem t-Test. Dabei wurden die rMFIs der A9 nach Kokultivierung mit den einzeln kultivierten A9 Zellen verglichen (signifikant: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,05$). Der Vergleich von A9 Zellen nach Kokultivierung mit nekrotischen HeLa Zellen und nach Färbung mit den verschiedenen *anti*-La Antikörpern erfolgte mittels einer *OneWay*-ANOVA nach Bonferoni (signifikant: ### $p < 0,001$).

4.4.3 Untersuchung zum Einfluss der Cysteine auf die Nukleinsäurebindung

Eine der wichtigsten Eigenschaften des La Proteins ist, wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, die Bindung von Nukleinsäuren, allen voran RNS. Im folgenden Kapitel sollte untersucht werden, inwiefern die Cysteine und ein oxidierendes oder reduzierendes Milieu Einfluss auf die Nukleinsäurebindung durch das La Protein haben. Dafür wurde als erstes mittels UV-Spektrenaufzeichnung analysiert, ob La wt und die Cysteinmutanten nach einer einfachen Reinigung (ohne Nukleinsäureverdaу) Nukleinsäuren gebunden haben. Später folgte dann die Kontrolle der Bindung verschiedenster Arten von Nukleinsäuren mit Hilfe von unterschiedlichen Immunoblotverfahren.

4.4.3.1 UV-Spektrenanalyse

In der folgenden Abbildung 42 sind die UV-Spektren der ohne Nukleinsäureverdau gereinigten Cysteinmutanten (gestrichelte Linien) im Vergleich zum La wt UV-Spektrum (durchgängige Linie) dargestellt.

Aus den Daten konnte entnommen werden, dass alle vier analysierten La Proteinvarianten ein ähnliches UV-Spektrum aufwiesen. Die Kurvenmaxima lagen übereinstimmend bei einer Wellenlänge von etwa 260 nm. Damit zeigten diese Ergebnisse ein Charakteristikum von UV-Spektrum, welches typisch für Nukleinsäuren ist. Bei einem klassischen UV-Spektrum für Proteine wäre ein Maximum bei einer Wellenlänge von 280 nm zu erwarten. Die UV-Spektren der Cysteinmutanten wiesen untereinander keine Unterschiede auf und im Vergleich zu La wt waren nur marginale Abweichungen im Spektrenverlauf zu verzeichnen.

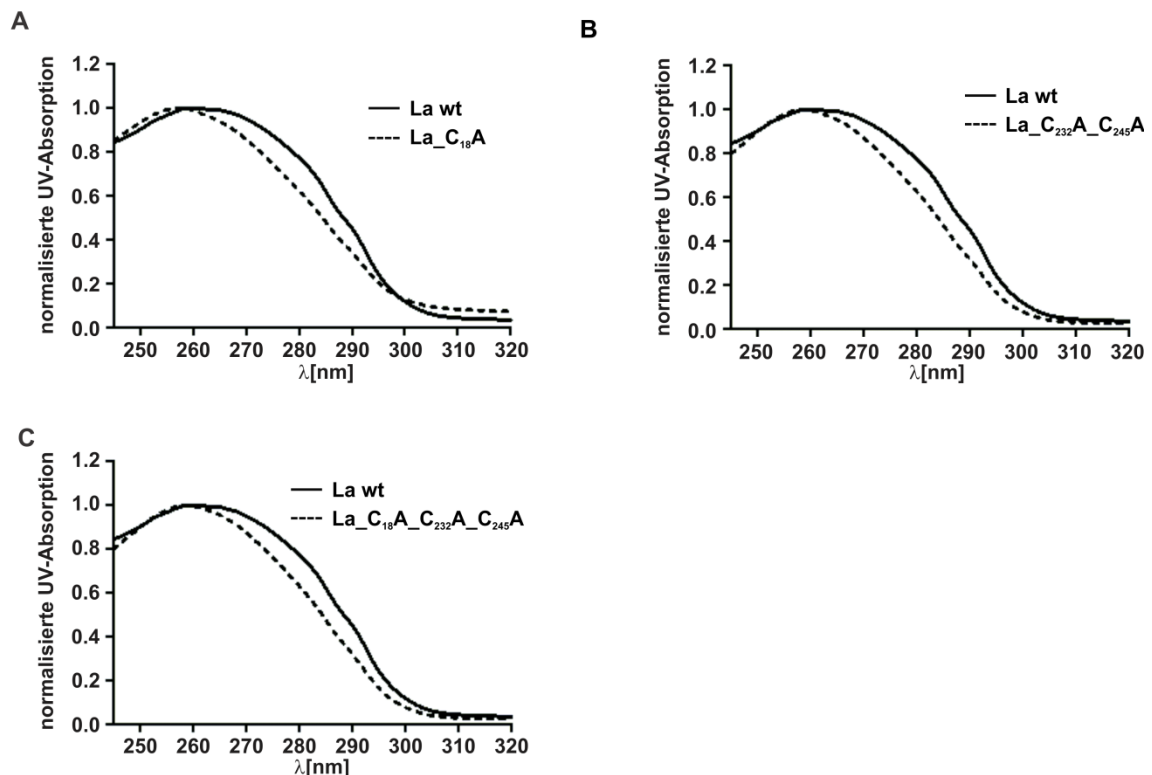


Abbildung 42: UV-Spektren der La Proteine. Für die Aufzeichnung der UV-Spektren wurden je ein Milliliter mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in 1x PBS verwendet. Die Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 240 nm bis 320 nm in einer Dreifachbestimmung aufgezeichnet und anschließend mit „Microsoft Excel“ ausgewertet. Die Auswertung beinhaltete die Bestimmung der Mittelwerte für jeden einzelnen Messpunkt der Messkurve, sowie die Normierung des Kurvenmaximums auf den Wert 1,0. Abschließend wurden die Daten mit „GraphPad Prism“ grafisch aufgearbeitet. Der Vergleich des La wt Spektrum mit dem der Monocysteinmutante La_C₁₈A ist in (A) gezeigt. Im Diagramm (B) ist der Spektrumsvergleich von La wt mit der Doppelcysteinmutanten, in (C) mit der Tripelcysteinmutante dargestellt.

Als wichtiges Ergebnis dieses Experiments war der Fakt zu verzeichnen, dass die La Proteine, welche mit der verkürzten Reinigungsmethode ohne Nukleinsäureverdau gereinigt wurden, stets in Assoziation mit Nukleinsäuren vorlagen.

In einem weiteren Versuch sollte geprüft werden, wie sich die UV-Spektren der Proben veränderten, nachdem in einer zweiten parallel durchgeführten Proteinreinigung ein zusätzlicher Nukleaseverdau erfolgte. Die Resultate sind in den Diagrammen in Abbildung 43 gezeigt. Die UV-Spektren der Proben ohne Nukleinsäureverdau wurden immer mit einer durchgehenden Linie dargestellt, während die Proben mit Nukleinsäureverdau mit einer gestrichelten Linie abgebildet wurden. Aus den Diagrammen (A), (B) und (C) für La wt, die Monocystein- und die Doppelcysteinmutante kann entnommen werden, dass ein zusätzlicher Nukleinsäureverdau während der Reinigung zu einer Verschiebung des UV- Spektrums führte. Die Maxima der ermittelten Spektren, für die Protben mit Nukleinsäureverdau, lagen bei einer Wellenlänge von 279 nm für das Wildtypprotein, 272 nm für die Monocysteinmutante und 268 nm für die Doppelcysteinmutante. Daraus lässt sich schließen, dass der Nukleinsäuregehalt der Proben durch den Nukleinsäureverdau während der Reinigung zurückgegangen ist. Anders verhielt es sich für die Tripelcysteinmutante. Hier zeigten die beiden UV-Spektren nur marginale Unterschiede. Die Maxima der Kurven lagen bei 259 nm ohne Nukleinsäureverdau und 264 nm mit einem solchen (D). Daraus ließ sich schließen, dass diese Probe noch einen hohen Nukleinsäuregehalt nach dem versuchten Nukleinsäureverdau aufwies. Daraufhin wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Tripelcysteinmutante Nukleinsäuren möglicherweise vor Nukleasen schützen könnte. In einem weiteren Teilversuch erfolgte, abschließend zu dieser Experimentgruppe, die UV-Spektrenanalyse einer weiteren La_{C18A}C_{232A}C_{245A} Probe. Ausgangsmaterial war dafür Protein aus der Reinigung inklusive Nukleinsäureverdau. Die Probe wurde mit RNaseA für eine Stunde bei RT in 100 mM Na-Acetatpuffer pH 4,5 inkubiert und anschließend in 1x PBS dialysiert. Parallel wurde eine pH-Wertkontrolle mitgeführt, bei der auf die Zugabe von RNaseA verzichtet wurde. Das Resultat ist im Diagramm (E) der Abbildung 43 gezeigt. War zunächst keine Verminderung des Nukleinsäuregehalts für die Tripelcysteinmutante zu dokumentieren, fand jedoch ein RNS-Verdau bei pH 4,5 statt. Die Daten in Abbildung 43 (E) zeigen eine entsprechende Verschiebung des UV-Spektrums. Das Maximum der ermittelten Kurve (orange) verschob sich von anfangs 259 nm auf 270 nm. Daraus konnte entnommen werden, dass unter diesen pH-Wert-Bedingungen auch ein Nukleinsäureverdau der RNS möglich war, welche zuvor an die Tripelcysteinmutante assoziiert vorlag. Die mitgeführte pH-Wert-Kontrolle (grau) zeigte keine Verschiebung im UV-Spektrum im Vergleich zur Ausgangsprobe des Versuchs. Dadurch lässt sich sagen, dass die Veränderung des UV-

Spektrums nicht auf den veränderten pH-Wert sondern auf das Wirken der RNaseA bei pH 4,5 zurückzuführen war.

Mit diesen gewonnenen Resultaten kann nun angenommen werden, dass auch eine Veränderung des pH Wertes zu einem Umfalten oder gar zur Denaturierung des La Proteins führen kann, was schließlich zum Verlust des gezeigten Nukleinsäureschutzes führt.

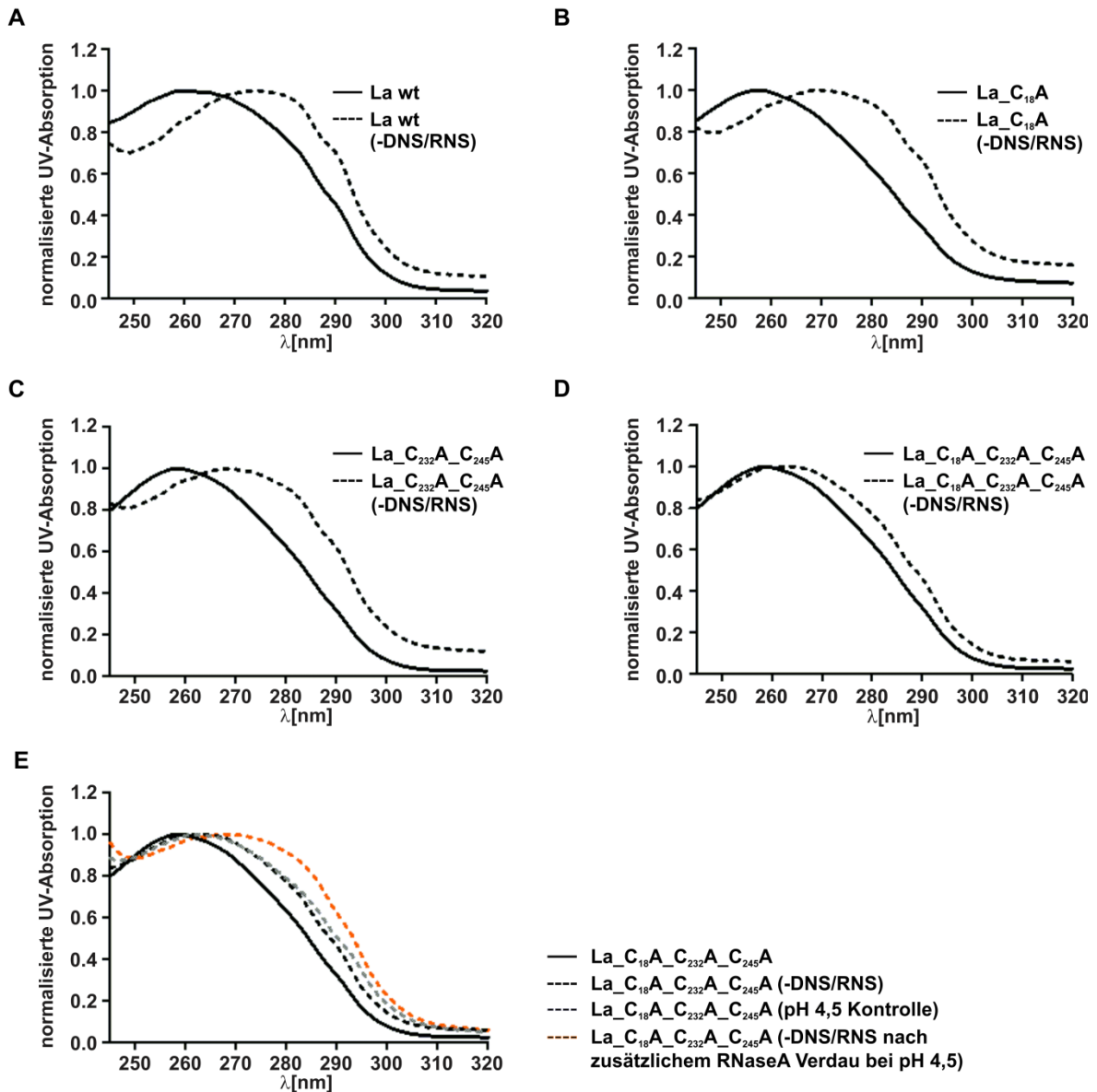


Abbildung 43: UV-Spektren der La Proteine mit und ohne Nukleinsäureverdau. Die Ermittlung der Daten erfolgte wie bereits für Abbildung 42 beschrieben. In den Diagrammen sind jeweils für eine La Proteinvariante die beiden UV-Spektren der Probe ohne und mit Nukleinsäureverdau dargestellt: La wt (A), La_{C18A} (B), La_{C232A_C245A} (C), La_{C18A_C232A_C245A} (D). Das Diagramm (E) stellt eine Erweiterung der Daten für die Tripelcysteinmutante (D) dar. Hier sind zusätzlich die UV-Spektren nach RNaseA Verdau bei pH 4,5 (orange) und der entsprechenden pH-Wert-Kontrolle dargestellt (grau).

4.4.3.2 Die Bindung von ssRNS, dsRNS und DNS-RNS-Hybriden durch die rekombinanten La Proteine

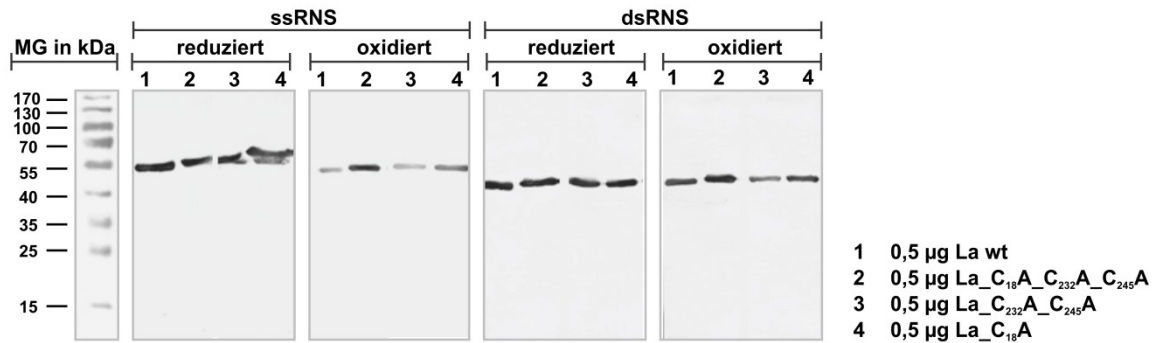
Durch die vorangegangenen UV-Spektrenanalysen konnte gezeigt werden, dass die La Proteine in der Regel in Assoziation mit Nukleinsäuren gereinigt werden. Auch in der Literatur wurde die Bindung von Nukleinsäuren, vor allem RNS ausführlich beschrieben. Nun sollte untersucht werden, ob es in Abhängigkeit der Cysteine und des Redoxmilieus Unterschiede zwischen dem La wt und den Cysteinmutanten in der Bindung verschiedener Nukleinsäuren gibt. Dabei wurde die Bindung von RNS und DNS-RNS-Hybriden nach Reduktion und Oxidation der La Proteine untersucht, siehe Abbildung 44.

In (A) der Abbildung 44 sind die Ergebnisse von vier Immunoblotanalysen zu sehen. Dabei zeigen die ersten beiden *Blots* die Resultate der ssRNS-Bindung nach Reduktion und Oxidation der La Proteine. Diesen Daten ist zu entnehmen, dass nach Reduktion, sowohl La wt als auch die drei Cysteinmutanten ssRNS gut gebunden hatten. Dies wurde aus den starken Banden bei etwa 50 kDa in allen vier Laufspuren ersichtlich. Die leichten Bandenverschiebungen in Laufspur vier wurden als *Blotting*-Artefakt gewertet und ändern nichts an der Aussage des Experiments, der ssRNS-Bindung durch die Monocysteinmutante La_C₁₈A. Die Oxidation der La Proteine, wie im zweiten *Blot* ersichtlich, änderte das ssRNS-Bindevermögen. Zwar zeigten alle vier Proteine ein entsprechendes positives Signal in Form von einer 50 kDa Bande, jedoch unterschieden sich die Signalintensitäten der einzelnen Banden. Während die Bande in der Laufspur der Tripelcysteinmutante sich kaum von der entsprechenden Vergleichsprobe des ersten *Blots*, dem Resultat nach Reduktion, unterschied, waren für La wt, La_C₁₈A und La_C₂₃₂A_C₂₄₅A nur Banden mit geringeren Signalintensitäten zu detektieren.

Im dritten und vierten *Blot* in Abbildung 44 (A) sind die Resultate der dsRNS-Bindung zu sehen. Auch hier wurde in die Bindung nach Reduktion (dritter *Blot*) und Oxidation (vierter *Blot*) der Proteine unterschieden.

Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der ssRNS-Bindung. Nach Reduktion der La Proteine waren keine Unterschiede zwischen den vier Proben zu erkennen. Sowohl La wt als auch die drei Cysteinmutanten zeigten eine deutliche dsRNS-Bindung mit vergleichbarer Signalintensität der erhaltenen Banden. Die dsRNS-Bindung nach Oxidation der La Proteine unterschied sich nur minimal. Es wurden wiederholt, ähnlich wie bei der ssRNS-Bindung, verminderte Signalintensitäten für die Banden der La wt, La_C₁₈A und La_C₂₃₂A_C₂₄₅A Proben detektiert, jedoch war diesmal der Unterschied weniger deutlich ausgeprägt. Die Assoziation der dsRNS an die Tripelcysteinmutante war abermals unbeeinflusst durch den vorangegangenen Oxidationsschritt des Experiments.

A RNS-Bindung



B Bindung von DNS-RNS-Hybriden

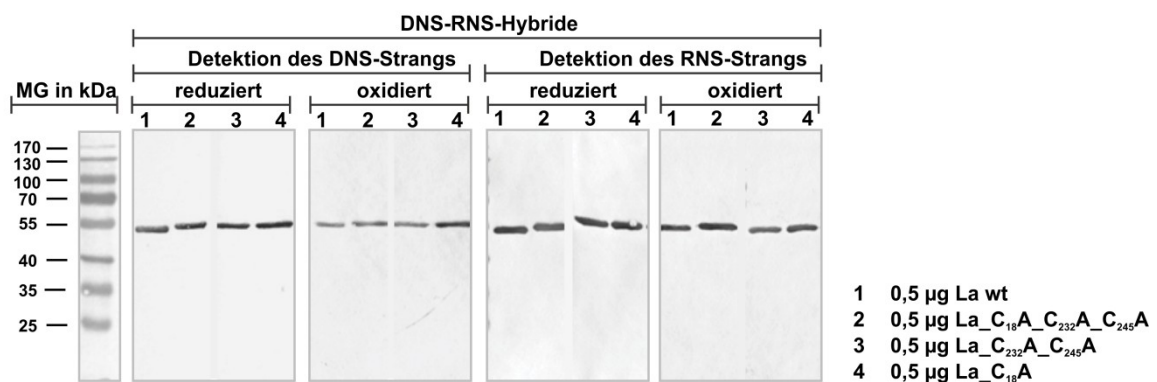


Abbildung 44: Immunoblotanalysen zur Untersuchung der ssRNS-, dsRNS- und DNS-RNS-Hybridbindung durch La wt und dessen Cysteinmutanten. Je 0,5 µg von La wt und den Cysteinmutanten wurden in 2x Ladepuffer mit DTT aufgenommen, auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen *geblottet*. Nach Blockieren der freien Bindestellen der Nitrozellulosemembranen wurden diese entweder für 5 min mit 50 mM DTT reduziert oder mit 0,5% H₂O₂ oxidiert. Nach diesen Behandlungsschritten wurden die Proben mit den verschiedenen Nukleinsäuren für 1 h bei RT inkubiert und anschließend konnte die biotinylierte RNS mittels eines murinen *anti-Biotin* Antikörpers (50 ng/ml) beziehungsweise die digoxigenierte DNS über einen murinen *anti-DIG* Antikörper (25 ng/ml), sowie einem *rabbit anti-mouse-IgG-AP* (1:1000) nachgewiesen werden. (A) Die linken beiden *Blots* zeigen die ssRNS-Bindung unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen. Die rechten beiden *Blots* zeigen die dsRNS-Bindungen durch die La Proteine unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen, wobei nur einer der beiden komplementären Stränge biotinyliert vorlag. (B) Die linken beiden *Blots* zeigen die Bindung von DNA-RNS-Hybriden unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen, nachgewiesen über den digoxigenierten DNS-Strang. Die rechten beiden *Blots* zeigen die Bindung der gleichen DNS-RNS-Hybride, jedoch erfolgte der Nachweis hier über den biotinylierten RNS-Strang.

In (B) der Abbildung 44 ist die Bindung von DNS-RNS-Hybriden gezeigt. Dabei geben die ersten beiden *Blots* die DNS-RNS-Hybridbindung nach Reduktion beziehungsweise Oxidation wieder, wobei der Nachweis über den DNS-Strang erfolgte. Die letzten beiden *Blots* zeigen die Ergebnisse des Experiments nach Detektion über den RNS-Strang. Dem Versuch war zu entnehmen, dass alle vier La Proteine in der Lage waren DNS-RNS-Hybride zu binden, erkennbar an den 50 kDa Banden in allen Laufspuren der vier *Blots*.

Der Nachweis der gebundenen Nukleinsäuren war sowohl über den DNS-, als auch über den RNS-Strang möglich. Außerdem zeigte sich wiederum der bereits beobachtete Effekt, dass die Signalintensität nach Oxidation der La Proteine zurückging.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass La wt und alle drei Cysteinmutanten in der Lage waren, ssRNS, dsRNS und DNS-RNS-Hybride zu binden. Unter reduzierenden Bedingungen waren keine Unterschiede zwischen den vier Proteinen und ihrem Vermögen, diese Nukleinsäuren zu binden, erkennbar. La Proteine, die jedoch über Cysteine verfügten und oxidierbar waren, wie La wt, die Monocystein- und die Doppelcysteinmutante, zeigten nach Oxidation eine verminderte Bindung dieser Nukleinsäurederivate. Im Gegensatz dazu blieb die nicht oxidierbare Tripelcysteinmutante von H₂O₂-Behandlungen unbeeindruckt und konnte ssRNS, dsRNS und DNS-RNS-Hybride unter reduzierenden oder oxidierenden Milieu gleich gut binden.

4.4.4 In vitro Untersuchungen zum Einfluss freien La Proteins auf das Immunsystem

4.4.4.1 Kultivierung von slanDCs in Anwesenheit von La wt und La_{C18A_C232A_C245A}

Es wurde bereits gezeigt, dass das La Protein durch Nekrose aus Zellen freigesetzt werden und an lebende Nachbarzellen binden kann. Darüber hinaus ist es in der Lage Nukleinsäuren zu binden. Damit ist das La Protein prädestiniert für die Aktivierung professioneller, antigenpräsentierender Zellen (APCs), wie zum Beispiel dendritische Zellen (DCs). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob gelöstes 25 nM La Protein zur Aktivierung dendritischer Zellen (hier slanDCs) führen kann. Dabei sollte zwischen La wt und der permanent reduzierten Konformation von La, La_{C18A_C232A_C245A}, unterschieden werden. Auch stand der potentielle Einfluss assoziierter Nukleinsäuren im Fokus. Durch die Verwendung von slanDCs in diesem Versuch, konnte speziell der Einfluss assoziierter RNS kontrolliert werden, da slanDCs über keine DNS-bindenden *Toll-like*-Rezeptoren verfügen [134]. Um den Einfluss der La Proteine auf slanDCs zu prüfen, wurde die Zellen in RPMI_{HS} mit La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A} kultiviert. Kam es während der Kultivierung zur slanDC Aktivierung, so wurde durch diese Zellen TNF α in deren Kulturüberstand sekretiert. Die Konzentration des TNF α s konnte anschließend mit Hilfe eines ELISAs gemessen werden. Je höher die bestimmte TNF α Konzentration, desto stärker war die vorangegangene slanDC Aktivierung. Insgesamt wurde der Versuch für drei slanDC Spender durchgeführt. Die Resultate eines repräsentativen Spenders sind in Abbildung 45 (A) gezeigt, die Zusammenfassung aller drei Spender in (B).

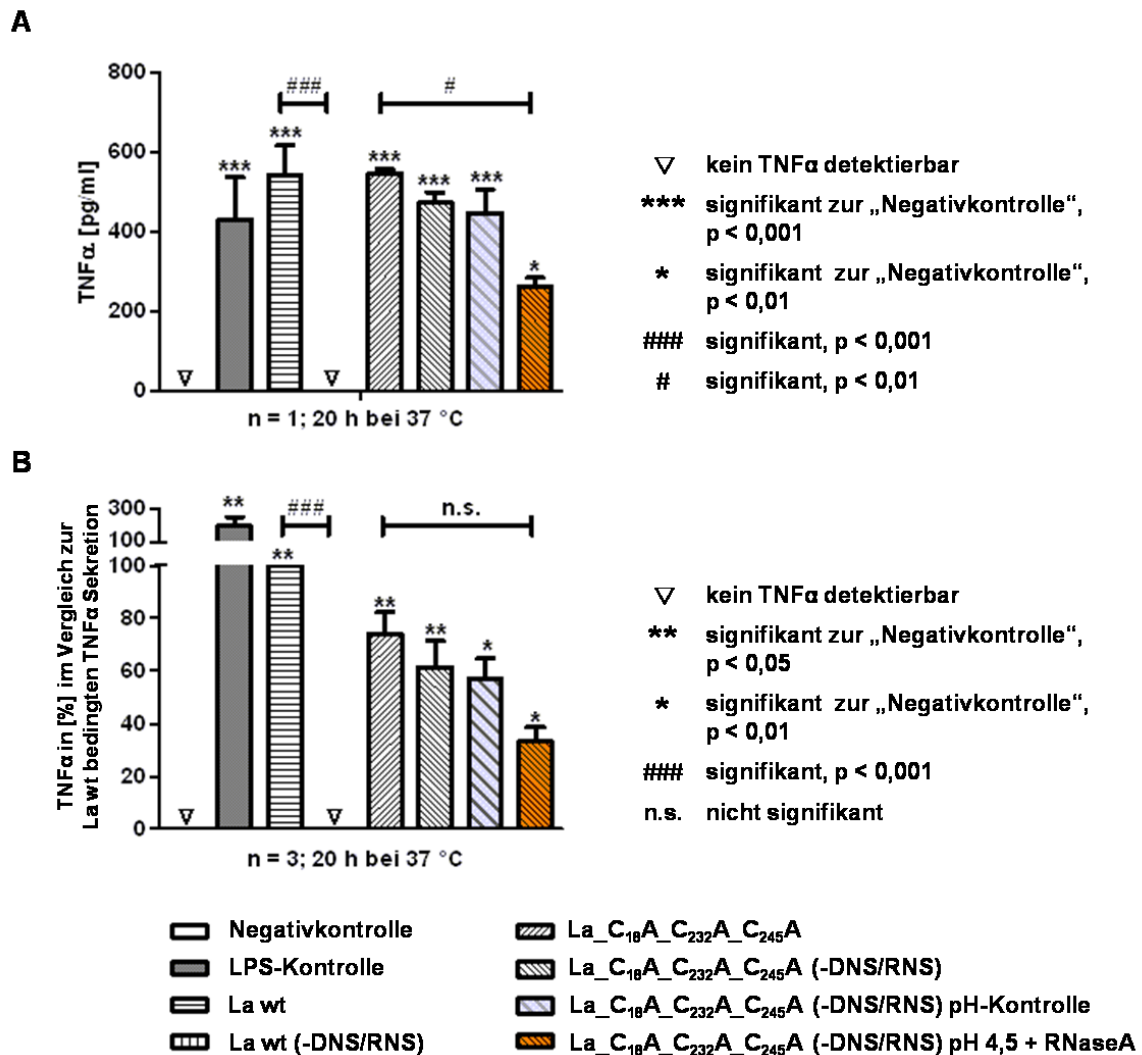


Abbildung 45: TNFα Sekretion aktivierter slanDCs nach 20 stündiger Kultivierung in An- und Abwesenheit von La wt beziehungsweise La_{C18A_C232A_C245A}. In einer ELISA-Studie wurde der Gehalt sekretierten TNFαs im Überstand von slanDCs bestimmt, nachdem sie entweder mit 25 nM La wt (quergestreift), La wt (-DNS/RNS) (längsgestreift), La_{C18A_C232A_C245A} (diagonalgestreift ///) oder La_{C18A_C232A_C245A} (-DNS/RNS) (diagonalgestreift \\\) in RPMI_{HS} für 20 Stunden kultiviert wurden. Als Negativkontrolle (weiß) wurden der Überstand von slanDCs betrachtet, deren Medium keine weiteren Zusätze enthielt. Als Positivkontrolle wurden slanDCs parallel mit 25 ng LPS in RPMI_{HS} kultiviert. In (A) sind die Resultate für einen repräsentativen slanDC Spender dargestellt. Dafür wurden für die einzelnen Balken die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen für jede Probe, inklusive der Standardabweichungen bestimmt. Für den Vergleich der Proben untereinander wurden als statistische Analyse eine *OneWay*-ANOVA nach Bonferoni durchgeführt (### p < 0,001 signifikant; signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle: *** p < 0,001). Die Grafik (B) zeigt die Zusammenfassung von drei verschiedenen Spendern. Der Vergleich zwischen den einzelnen Proben und dessen statistische Analyse erfolgten mit einem t-Test. Dabei wurden die mittleren TNFα Konzentrationen der einzelnen Proben miteinander verglichen (## p < 0,01 signifikant; signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle: ** p < 0,01; * p < 0,05).

In den Proben ohne Zusätze im Kultivierungsmedium wurde kein TNFα gemessen. Die Inkubation in LPS-haltigem Medium, welches als Garant für die slanDC Aktivierung (Positivkontrolle) eingesetzt wurde, konnte eine Konzentration von etwa 450 pg/ml TNFα detektiert werden. Vergleichbare Mengen an TNFα wurden nach der Kultivierung in

Medium mit La wt gemessen. Ein Unterschied zeigte die TNF α Konzentration nach der Kultivierung von slanDCs in Anwesenheit von La wt (-DNS/RNS), denn für diese Probe konnte kein TNF α detektiert werden. Auch die Ergebnisse für die Analysen der slanDCs Kultivierung in Anwesenheit der Tripelcysteinmutante zeigten interessante Resultate. So konnte für die La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A eine TNF α Konzentration von knapp 600 pg/ml ermittelt werden. Im Gegensatz zur vergleichbaren La wt Probe, zeigte La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A (-DNS/RNS) als Folge der slanDC Kultivierung ebenfalls eine hohe TNF α Konzentration von zirka 500 pg/ml. Eine ähnliche Menge TNF α produzierten slanDCs, die in Anwesenheit mit der La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A (-DNS/RNS) pH-Kontrolle, wie sie bereits aus den UV-Spektrenanalysen bekannt ist, inkubiert wurden. Lediglich die letzte Tripelcysteinmutantenprobe La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A (-DNS/RNS) pH 4,5 + RNaseA zeigte eine verminderte TNF α Konzentration im Kultivierungsüberstand der slanDCs, etwa 300 pg/ml. Das bedeutete, die RNaseA Behandlung bei pH 4,5 resultierte in einer verminderten slanDCs Aktivierung, was sich in einer um die Hälfte verringerten TNF α Konzentration des entsprechenden Kulturüberstandes zeigte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass La Proteine, lagen sie frei im Medium vor, unter Umständen zur Aktivierung von slanDCs führen konnten. Diese Aktivierung war jedoch nicht abhängig vom Redoxzustand des Proteins. Entscheidend war die Assoziation von Nukleinsäuren. Da im Fall der La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A Mutante bereits eine Art Nukleinsäureschutz beobachtet werden konnte, siehe 4.4.1, war es nicht verwunderlich, dass auch durch die La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A (-DNS/RNS) Probe eine slanDC Aktivierung, gekennzeichnet durch die dokumentierte TNF α Sekretion, zu verzeichnen war. Wurde die Tripelcysteinmutante jedoch einer zusätzlichen RNaseA Behandlung bei pH 4,5 unterzogen, so war auch für dieses Protein eine Verminderung des Nukleinsäuregehalts im UV-Spektrum und eine geringere slanDC-Aktivierung, in Form von einer niedrigeren TNF α Sekretion detektierbar. Daraus lässt sich schließen, dass für die Aktivierung von dendritischen Zellen im Allgemeinen gilt: nicht das La Protein, sondern La Protein assoziierte Nukleinsäuren können zur Aktivierung von DCs führen.

4.4.4.2 Kultivierung von slanDCs in Anwesenheit von La wt nach Inkubation in SLE Seren beziehungsweise Seren gesunder Spender

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass La Protein assoziierte Nukleinsäuren in der Lage waren dendritische Zellen zu aktivieren, sollte nun ein weiterer Versuch dieser Art durchgeführt werden. Ziel der Untersuchung war es, eine potentielle Aktivierung von dendritischen Zellen *in vitro* nachzustellen, wie sie eventuell bei einem SLE Patienten Auslöser für einen inflammatorischen Anstoß sein könnte. Aus der Literatur ist bekannt,

dass es bei SLE Patienten Defizite in der Beseitigung apoptotischen Materials gibt [7; 8]. Dies hat oft die Entstehung von sekundären Nekrosen zur Folge [9]. Durch solche sekundären Nekrosen, kann es zur Freisetzung großer Mengen La Proteins und Nukleinsäuren kommen. Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass SLE Patienten oft Defekte in Nukleasegenen aufweisen, was zu einer verminderten Aktivität bis hin zum Verlust dieser führt [143; 144]. Somit wäre auf Grund der bisher gesammelten Daten zu erwarten, dass es im SLE Patienten nach sekundären Nekrosen zu einer erhöhten Menge an freiem La Protein kommt. Dieses kann wiederum Nukleinsäuren assoziieren, die ebenso in hoher Konzentration frei vorliegen, da deren Abbau auf Grund der eingeschränkten Nukleaseaktivität vermindert ist. Um zu prüfen, ob eine solche Situation bei SLE Patienten vorliegen könnte, wurde wiederum ein slanDC Aktivierungsversuch durchgeführt. Dafür wurde das La Protein [25 nM] entweder unbehandelt (La wt), nach Nukleaseverdau (La wt (-DNS/RNS)), sowie nach einstündiger Inkubation in Serum, zu slanDCs dazugegeben. Das in Serum inkubiertem La Protein wurde insgesamt in sechs verschiedene Proben unterschieden. Für die Inkubation wurden einmal drei verschiedene SLE Patientenserum verwendet und zum Vergleich dazu wurden parallel drei unterschiedlichen Seren gesunder Spender eingesetzt. Die Seren lagen anschließend bei der Kultivierung der slanDCs (1:20) verdünnt im Versuchsansatz vor. Nach einer zwanzig stündigen Zellkultivierung, wie sie schon für die Versuche aus Kapitel 4.4.4.1 erfolgte, wurde die Aktivierung der Zellen über der TNF α Gehalt im Zellkulturüberstand bestimmt. Das erfolgte wiederum mit Hilfe eines TNF α ELISAs. Die ermittelten TNF α Konzentrationen sind der Grafik in Abbildung 46 zu entnehmen.

Auch bei diesem Experiment konnte zunächst festgestellt werden, dass La wt zu einer TNF α Sekretion durch slanDCs führte, knapp 400 pg/ml und normiert auf 100 %. Im Gegensatz dazu war für die Kultivierung von slanDCs in Gegenwart von La wt (-DNS/RNS) bei diesem slanDCs Spender eine marginale TNF α Sekretion von etwa 15 % des La wt Kontrollwertes. Die Resultate der slanDC Kultivierungen mit zugefügten La Protein, welches zuvor in verschiedenen SLE Seren inkubiert wurde, zeigten folgendes: Für alle drei SLE-Spender Seren wurde sekretiertes TNF α detektiert. Die Konzentrationen lagen im Mittel bei 55 % der La wt Referenz. Wurde das für den Versuch verwendete La Protein zuvor in Serum gesunder Spender inkubiert, so waren noch geringere TNF α Konzentration in den Überständen der slanDC Kultivierungen zu verzeichnen. Sie ergaben eine mittlere TNF α Menge von 26 % des La wt Kontrollwertes.

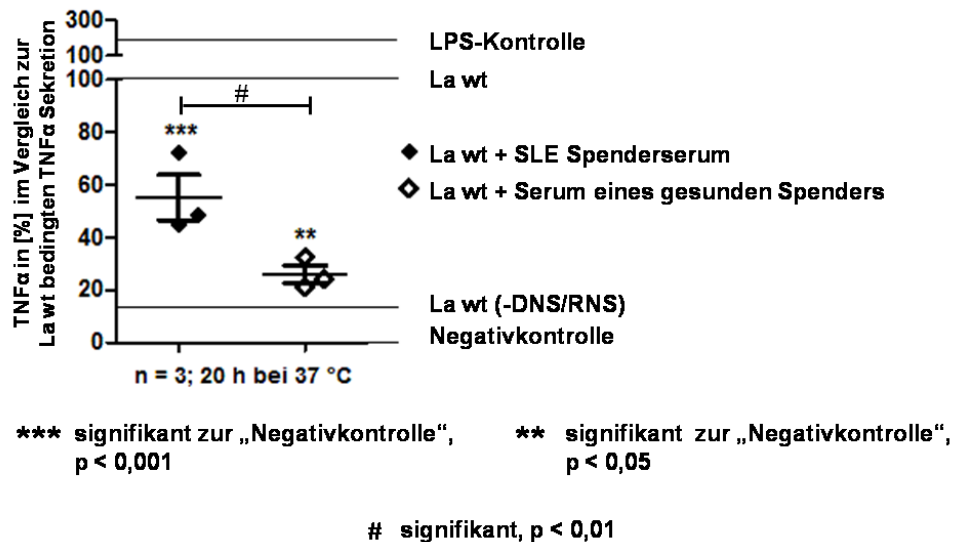


Abbildung 46: TNF α Sekretion von slanDCs eines repräsentativen Spenders nach Kultivierung in Anwesenheit von La wt ohne und mit vorheriger Inkubation in verschiedenen Seren. In einer ELISA-Studie wurde der Gehalt sekretierten TNF α im Überstand von slanDCs bestimmt, nachdem sie entweder mit 25 nM La wt, La wt (-DNS/RNS) oder Serum inkubierten La wt für 20 Stunden kultiviert wurden. Die ermittelten TNF α Konzentrationen wurden nach ihrer Bestimmung normiert, wobei die erzielte TNF α Menge nach Inkubation mit La wt als 100 % angenommen wurde. Die Kontrollen „Negativkontrolle“, „LPS-Kontrolle“, „La wt“ und „La wt (-DNS/RNS)“ wurden als Fixwerte im Diagramm in Form von Linien eingezeichnet. Die Resultate für die Dreifachbestimmung jeder Serumprobe wurden gemittelt und in Gruppen „La wt + SLE Spenderserum“ beziehungsweise „La wt + Serum eines gesunden Spenders“ dargestellt. Für die beiden Versuchsgruppen sind zudem jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung eingezeichnet. Für den Vergleich der Gruppenresultate zur Negativkontrolle wurde als statistische Analyse ein t-Test durchgeführt (signifikant: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,05$), ebenso für die Signifikanzanalyse zwischen den beiden Gruppen (signifikant: # $p < 0,01$).

Aus diesen Daten ließ sich folgender Trend entnehmen. Die Inkubation von La wt in Seren gesunder Spender führte zu einer stark verminderten TNF α Sekretion im Vergleich zur La wt Referenz. Vermutlich war dieser Effekt auf Nukleasen, im speziellen RNasen, in den Seren zurückzuführen. Wurde La wt in Seren von SLE Patienten inkubiert, zeigten sich geringere Unterschiede in der TNF α Konzentration im Vergleich zur La wt Referenz. Höchst wahrscheinlich war die hier beobachtete TNF α Sekretion auf eine geringere RNaseaktivität der SLE Seren zurückzuführen. Deutlich wurde auch, dass sich beide Versuchsgruppen in ihren Resultaten bezüglich der TNF α Sekretion signifikant unterschieden.

Eventuelle Bedenken auf Grund des in diesem Konventionsassays verwendeten Mediums RPMI_{HS}, mit inaktiviertem Humanserum, können vernachlässigt werden, da die slanDCs in allen Proben inklusive der La wt Kontrolle in diesem Medium kultiviert wurden. Dadurch wäre ein negativer Effekt durch eine potentiell inkomplette Deaktivierung der serumeigenen RNase in jeder Probe gleich groß.

Diese Ergebnisse können als erste Indizien für die Richtigkeit der anfänglich aufgestellten Hypothese gewertet werden. Um den Sachverhalt statistisch noch genauer absichern zu können, müssten in einem größeren Versuchsansatz weitere Seren, sowohl von SLE Patienten, als auch von gesunden Spendern miteinander verglichen werden. Außerdem sollten diese Versuche, dann für weitere slanDC Spender durchgeführt werden. Das war im Rahmen dieser Arbeit auf Grund der limitierten Zugänge zu Patientenmaterial und slanDCs nicht möglich.

5. Diskussion

5.1 Redoxabhängige Antigenerkennung des La Proteins durch *anti*-La mAK 312B und 7B6

Seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts sind das La Protein und dessen assoziierte Autoimmunkrankheiten, wie SLE und das Primäre Sjögren's Syndrom, Teil der weltweiten Forschung. Hauptziel der zahlreichen Untersuchungen und Studien sind eine Erweiterung zum Verständnis der Entstehung von solchen Autoimmunerkrankungen und die mögliche Entwicklung von Therapieansätzen zur Behandlung Betroffener. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit war die Generierung monoklonaler *anti*-La Antikörper ein wesentlicher Schritt zur Erlangung neuer Erkenntnisse über das La Protein selbst, wie auch über die Entwicklung und das Verhalten von Patientenautoantikörpern. Zu dieser Forschungsarbeit leistete die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Bachmann einen großen Beitrag [107–109]. So lieferte zum Beispiel die Dissertation von C. Franke 2009 [109] nicht nur die Charakteristika zahlreicher *anti*-La mAK, sondern zeigte auch erste Hinweise für eine mögliche Redoxsensitivität des La Proteins auf. Damit konnte belegt werden, dass die *anti*-La mAK der 312B Gruppe (312B, 2F9, 27E und 32A) nur reduziertes La Protein in *Westernblot*- und ELISA-Studien erkannten. Daneben wurde die besondere Eigenschaft des *anti*-La mAK 7B6 deutlich. Der *anti*-La mAK 7B6 konnte das La Protein in Zellen nur nach Oxidation dieser erkennen, jedoch nicht unter physiologischen Umständen. Daher schloss schon C. Franke auf ein verdecktes 7B6-Epitop in Zellen durch einen potentiellen Bindepartner.

5.1.1 Redoxabhängige Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 312B

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hinweise auf eine redoxabhängige Antigenerkennung durch die *anti*-La mAK 312B und 7B6 unter der Zuhilfenahme erstmalig generierter Cysteinmutanten (La_C₁₈A, La_C₂₃₂A_C₂₄₅A und La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A) zu verifizieren. Mit den Ergebnissen des Abschnittes 4.2.1 konnten die Aussagen aus der Arbeit von C. Franke [109] bezüglich der redoxabhängigen Antigenerkennung durch die *anti*-La mAK 312B und 2F9 bestätigt werden. Sie waren ausschließlich in der Lage, reduziertes La Protein zu erkennen. Mit Hilfe der Cysteinmutanten konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die Reduktion des Cysteins an Position 18 entscheidend für die Antigenerkennung war. Die Cysteine C₂₃₂ und C₂₄₅ spielten bei der Epitoperkennung durch den 312B keine Rolle, was die *Westernblot*-Analysen in Abbildung 22 bestätigten. Der Verlust der Antigenerkennung eines Antikörpers nach Oxidation lässt sich theoretisch durch verschiedene Gründe erklären. Naheliegend ist die Bildung einer intra- oder

intermolekulare Disulfidbrücke über das im Epitop lokalisierte Cystein. Durch eine solche Disulfidbrücke würde es zum Verdecken des Epitops durch den Bindepartner, in diesem Fall der C-terminalen La Domäne oder einem zweiten La Molekül, kommen. Zusätzlich spielte wahrscheinlich eine Veränderung der Sekundärstruktur innerhalb des Konformationsepitops eine entscheidende Rolle. Dafür sprechen die Daten der CD-Spektren in Ab- und Anwesenheit von Kupferionen, welche eine Veränderung der Helikalität besonders für La Proteine mit einem Cystein an Position 18 zeigten. Für die Verdeutlichung der eben dargestellten Sachverhalte soll Abbildung 47 behilflich sein.

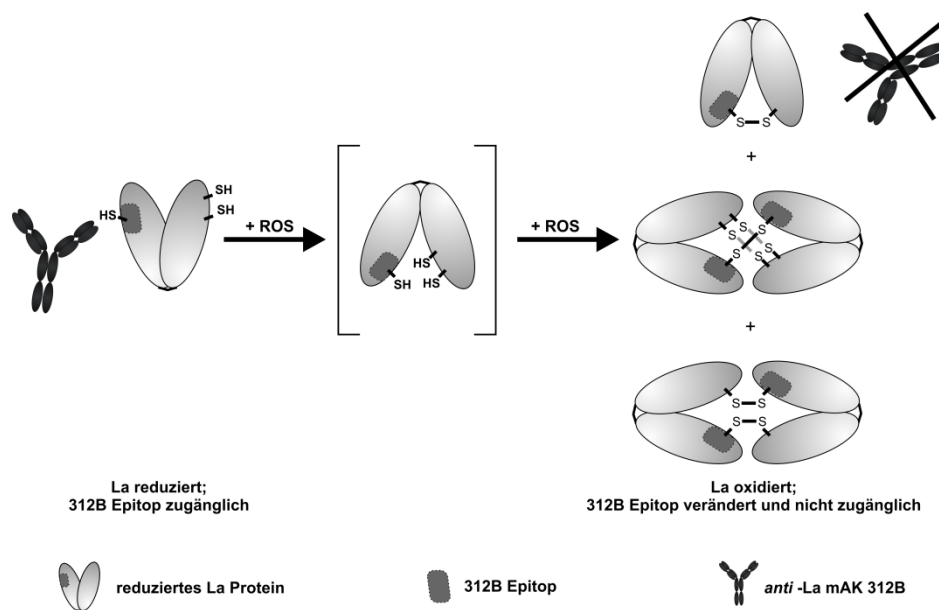


Abbildung 47: Schematische Darstellung der redoxabhängigen Antigenerkennung durch den *anti-La mAK 312B* für La wt. Der *anti-La mAK 312B* erkennt reduziertes La Protein. Durch den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt es zu einem Umklappen des Proteins. Diesen Mechanismus sollten sowohl das La wt als auch die Cysteinemutanten vollführen können. Kommt es zur Stabilisierung der oxidierten Konformation des La Proteins durch eine intra- oder intermolekulare Disulfidbrücke, liegt das 312B Epitop wahrscheinlich verdeckt und bezüglich seiner Sekundärstruktur verändert vor, sodass es nicht mehr durch den 312B oder einen verwandten *anti-La mAK* erkannt werden kann. Drei denkbare Varianten für die Stabilisierung sind hier dargestellt. Zuerst ist ein Monomer mit intramolekularer Disulfidbrücke zu sehen. Für deren Ausbildung könnten das N-terminale Cystein im 312B Epitop und eines der beiden C-terminalen Cysteine verantwortlich sein. Über das zweite C-terminale Cystein könnten weitere La Proteine assoziiert werden, was die Entstehung von Oligomeren erklären würde. Neben dem Monomer sind zwei denkbare Dimerkonformationen dargestellt.

In dieser Abbildung ist das Umklappen des La Proteins unter den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der damit verbundene Verlust der Antigenerkennung durch den *anti-La mAK 312B* am Beispiel von La wt schematisch gezeigt. Das La wt Protein ist in der Lage, die oxidierte Konformation zu stabilisieren, in dem es entweder eine intra- oder intermolekulare Disulfidbrücke ausbildet. Eine solche Stabilisierung ist auf Grund der fehlenden Cysteine für die Tripelcysteinmutante nicht möglich, siehe Abbildung 48 (A).

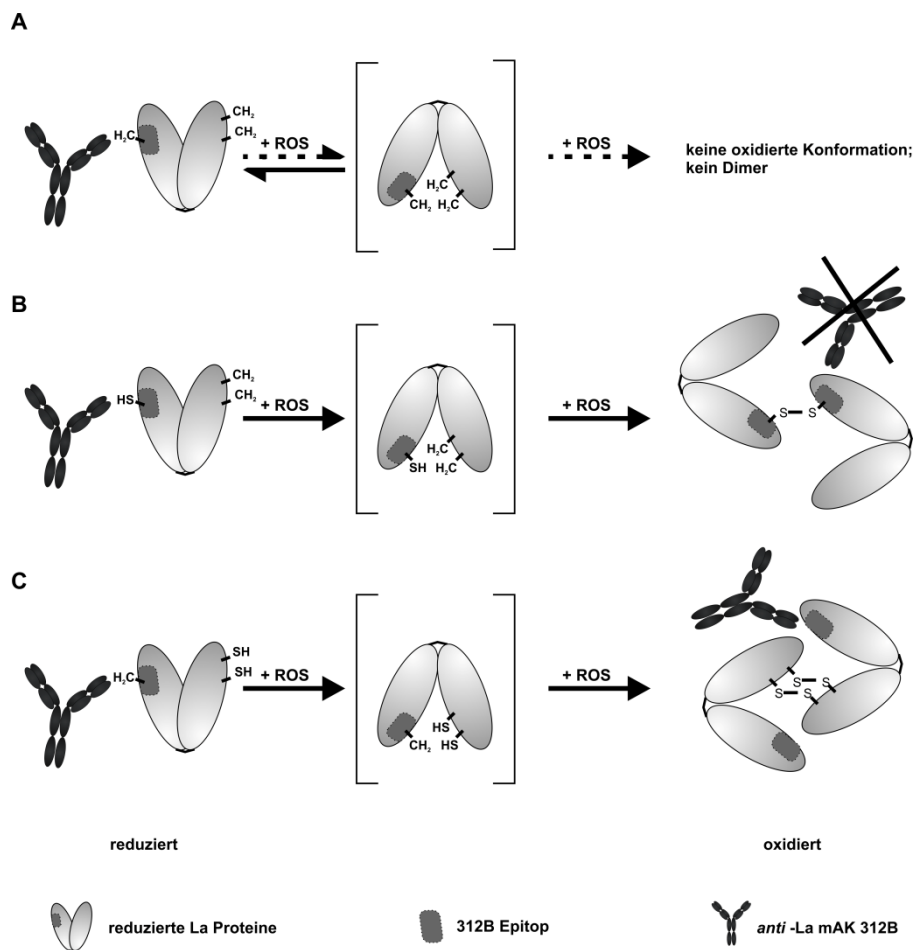


Abbildung 48: Schematische Darstellung zur Oxidation der Cysteinmutanten und deren Erkennung durch den *anti-La mAK 312B*. (A) Oxidation der Tripelcysteinmutante, (B) Oxidation der Doppelcysteinmutante, (C) Oxidation der Monocysteinmutante.

Die Tripelcysteinmutante La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A kann wegen ihrer fehlenden Cysteine nach dem Umfalten keine Stabilisierung der oxidierten Konformation vornehmen und würde daher wahrscheinlich leicht in die reduzierte Konformation des La Proteins zurückklappen. Dadurch bleibt die Erkennung des 312B Epitops erhalten.

Im Vergleich zur Tripelcysteinmutante verfügt die Doppelcysteinmutante noch über das N-terminale Cystein C₁₈. Daher ist eine Stabilisierung eines Dimers, wie es in den *Westernblot*-Analysen aus Abbildung 21 ersichtlich wurde, möglich. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 48 (B) gezeigt. Jedoch erlaubt es die Disulfidbrücke über die N-terminalen Cysteine und der damit verbundenen Sekundärstrukturveränderung nicht, dass diese Dimere durch den Antikörper der 312B noch erkannt wird (siehe die Ergebnisse aus Abbildung 22).

Die Monocysteinmutante verfügt noch über die beiden C-terminalen Cysteine, welche für die Stabilisierung der in den *Westernblot*-Analysen detektieren Dimere in Frage kommen. Hierbei ist jedoch mit einer veränderten Quartärstruktur im Vergleich zum La wt Dimer aus Abbildung 47 zu rechnen. Das Besondere an dieser Mutante ist, dass das C₁₈ substituiert wurde, wodurch der N-Terminus und damit das 312B Epitop durch oxidativen Stress eher unbeeinflusst blieb. Dadurch konnte der *anti*-La mAK 312B sowohl das Monomer als auch das Dimer der Monocysteinmutante erkennen (siehe Abbildung 48 (C)).

5.1.2 Redoxabhängige Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 7B6

Ebenso wie für die Untersuchungen zur redoxabhängigen Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 312B wurden auch die Cysteinmutanten genutzt, um die Besonderheiten der Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 7B6 in *Westernblot*- und ELISA-Studien zu untersuchen. Hierbei wurde festgestellt, dass der 7B6 mAK *in vitro* nicht zwischen reduziertem und oxidiertem La Protein unterscheiden kann. Die Cysteine des La Proteins und Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur auf Grund eines veränderten Redoxmilieus spielen für die Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 7B6 keine Rolle. Eine redoxabhängige Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 7B6 war nur bei Zellfärbungen zu beobachten, siehe Abbildung 28 und Abbildung 29.

Es zeigte sich, dass die im Zellkern reduziert vorliegenden EGFP-La wt oder EGFP-La_C₁₈A_C₂₃₂A_C₂₄₅A Fusionsmoleküle nicht durch den 7B6 mAK nachgewiesen werden konnten. Jedoch war der Antikörper in der Lage, EGFP-La wt nach Oxidation lebender Zellen mit H₂O₂ im Zytoplasma deutlich zu detektieren. Darüber hinaus war der 7B6 mAK in der Lage sogar La Protein in fixierten Zellen zu färben, nachdem diese oxidiert wurden. Für eine Erklärung der möglichen Ursachen dieser Beobachtung soll die Abbildung 49 dienen. Es ist bekannt, dass das La Protein unter physiologischen Bedingungen reduziert im Zellkern vorliegt. Damit es im Zellkern für die Erfüllung seiner Aufgaben zurückgehalten werden kann, verfügt es über ein nukleäres Retentionselement (NRE) im Sequenzabschnitt 316 – 332. Für das Zurückhalten von La im Zellkern muss ein nukleärer, bisher noch unbekannter Bindepartner an diesem Sequenzabschnitt assoziiert vorliegen, so wie es von Bayfield *et al.* (2007) beschrieben wurde [57]. Vergleicht man die Lokalisation der NRE von La und dem 7B6 Epitop (AS 295 – 344), so fällt auf, dass das NRE innerhalb der α -Helix des 7B6 Epitops positioniert ist. Daher kann angenommen werden, dass ein nukleärer Bindepartner, welcher an das NRE von La assoziiert vorliegt, die Antigenerkennung durch den *anti*-La 7B6 mAK blockiert. Kommt es jedoch durch den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies zu einer Veränderung der Konformation von La und dem nukleären Bindepartner, so lösen sich beide voneinander.

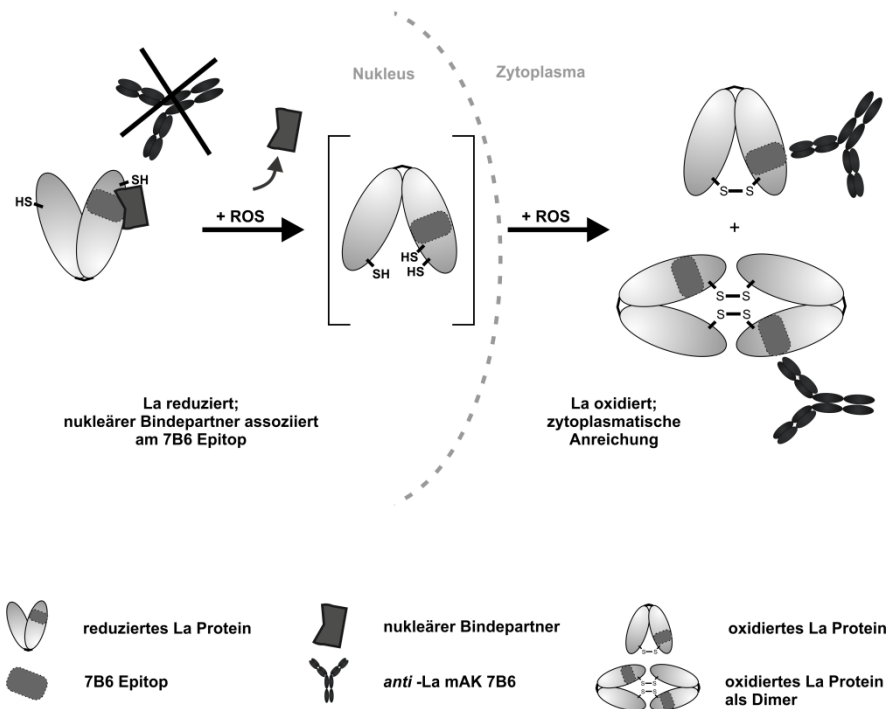


Abbildung 49: Schematische Darstellung der redoxabhängigen Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 7B6 in Zellen. Im Zellkern liegt das La Protein reduziert vor. Außerdem wird es dort wahrscheinlich durch einen potentiellen Bindepartner, der an das NRE von La (AS 316 - 332) assoziiert ist, zurückgehalten. Dieser Bindepartner blockiert vermutlich auch die Antigenbindestelle (AS 295 - 344) des 7B6 mAK, welche mit dem NRE überlappt. Durch den Einfluss von ROS kommt es zur Konformationsänderungen beider Proteine. So wird der nukleäre Bindepartner abgespalten. Das ermöglicht den Export von La ins Zytoplasma und die Stabilisierung oxidierten La Proteins. Außerdem liegt das 7B6 Epitop nun frei zugänglich vor und kann durch den mAK erkannt werden.

Das La Protein wird nicht länger im Zellkern zurückgehalten, kann sich im Zytoplasma anreichern und oxidierte, durch Disulfidbrücken stabilisierte, Konformationen annehmen. Diese können nun durch den *anti*-La mAK 7B6 erkannt werden, da sein Epitop nicht länger blockiert vorliegt. So wird deutlich, dass die Cysteine des La Proteins selbst keinen Einfluss auf die Antigenerkennung durch den *anti*-La mAK 7B6 haben, vielmehr wird die Zugänglichkeit des 7B6 Epitops im Zellkern durch den nukleären Bindepartner beeinträchtigt. Mit diesen Ergebnissen konnten die ersten Daten von C.Franke [109] belegt und verifiziert werden.

Im Falle der fixierten und oxidierten Proben (Abbildung 29 B, Bild (f)) schien es durch die Cu(II)SO_4 Behandlung nach der Fixierung zur partiellen Störung der Interaktion zwischen La Protein und nukleären Bindepartner gekommen zu sein. Dies resultierte in einer für den *anti*-La 7B6 mAK zugänglichen Submenge des La Proteins. Aus dem Rahmen fallen die Resultate der 7B6 gefärbten Zellen, welche nach Oxidation und Fixierung wieder reduziert wurden (Abbildung 29 B, Bild v). Es wäre zu erwarten gewesen, dass die versuchsabschließende Reduktion keinen Einfluss auf die Antigenerkennung durch den

7B6 mAK mehr gehabt hätte. Das 7B6 Epitop wäre durch die anfängliche Oxidation zugänglich geworden und der nukleäre Bindepartner hätte, verblieben im Zellkern, keinen negativen Einfluss mehr auf die Detektion durch den 7B6 mAK gehabt. Über Gründe für die Beobachtung im Experiment kann nur spekuliert werden, selbst ein falsch negatives Resultat durch ein experimentelles Artefakt kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt sollte dieses Teilergebnis die Idee zur Antigenerkennung durch den 7B6 mAK jedoch nicht schmälern, da es sich bei der Probenreduktion nach Zellfixierung um eine artifizielle Situation handelte. Darüber hinaus wird die Theorie zur Antigenerkennung durch den 7B6 mAK durch zusätzliche unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bachmann gestützt. Diese ergaben, dass der *anti*-La mAk 7B6 in der Lage ist, auch das Fusionsprotein EGFP-La_{C18A_C232A_C245A} in 3T3 Zellen nach H₂O₂ Behandlung der Zellen im Zytoplasma anzufärben, während keine *anti*-La Signale mit Hilfe dieses mAKs in unbehandelten 3T3 EGFP-La_{C18A_C232A_C245A} Zellen zu detektieren waren.

5.1.3 Redoxabhängige La Proteinerkennung durch Autoantikörper aus SLE Patientenseren

Im Kapitel 4.2.2 wurde beschrieben, dass sich die analysierten 64 SLE Patientenseren hinsichtlich ihrer präferenziellen Antigenerkennung gegenüber oxidierten oder reduzierten La Protein unterscheiden ließen. Erstmalig konnte gezeigt werden, dass auch bei SLE Patienten Antikörper auftreten können, die entweder oxidiertes oder reduziertes La Protein bevorzugt binden können. In der aktuellen Literatur zur Diagnostik von Autoantikörpern sind keine Hinweise zu finden, dass bei den entsprechenden Analysen zwischen Autoantikörpern mit verschiedenen Antigenpräferenzen unterschieden werden könnte. Mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT) mit HEp-2 Zellen kann reduziertes La Protein in den Zellkernen der HEp-2 Zellen durch Patientenautoantikörper angefärbt werden. Würde ein Patientenserum jedoch Antikörper beinhalten, welche ausschließlich Konformation oxidierten La Proteins erkennen könnte, so wären jene ANAs durch diesen Test nicht erkennbar. In der Diagnostik erhielte man dann falsch negative Resultate für jene SLE Patientenseren. Im Allgemeinen kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich bei ANAs stets um polyklonale Antikörper handeln dürfte und dadurch verschiedene Antigene innerhalb des La Proteins simultan erkannt werden können. Dies würde die Erkennung von ausschließlich reduziertem oder oxidiertem La Protein durch ANAs eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Trotzdem wäre an dieser Stelle eine umfangreichere Studie mit größerer Anzahl von Patientenproben zu empfehlen, um letztlich beurteilen zu können, ob eine Erweiterung von Tests in der Diagnostik von ANAs gegen das La Protein von Nöten sein könnte.

Des Weiteren entstanden aus den gewonnenen Ergebnissen erneut Fragen, welche sich ebenfalls nur durch Folgeanalysen von Patientenmaterial beantworten ließen. Die in 4.4.2 verwendeten 64 Patientenserum wurden in einer Art Blindstudie analysiert. Das heißt, es lagen keine weiteren Daten über die einzelnen Patientenserum vor. So waren Geschlecht, Alter, Krankheitsstadium und Informationen über eventuelle Behandlungen der einzelnen Spender nicht bekannt. Daher war es auch nicht möglich, Aussagen über eventuelle Korrelationen zwischen dem Auftreten eines dieser Merkmale und der detektierten präferentiellen Antigenerkennung zu treffen. In einer detaillierten Folgestudie könnte außerdem herausgefunden werden, ob eine beginnende SLE Erkrankung mit dem Auftreten einer der beiden präferentiellen Antigenerkennung korreliert. Weiterhin könnte untersucht werden, ob und wie weit sich diese im Verlauf der Krankheit über längeren Zeitraum eventuell verändert beziehungsweise ob sich Unterschiede zwischen Phasen mit einem akutem Krankheitsschub und Ruhephasen aufzeichnen lassen.

5.2 Einfluss der La Cysteine auf molekularen Level

Der Einfluss der Cysteine des La Proteins auf molekularem Level wurde in verschiedenen Studien untersucht. In *Westernblot*-Analysen, wie in Abbildung 21 und Abbildung 22 gezeigt, wurde deutlich, dass sie an der Stabilisierung von Di- und Oligomeren beteiligt sind. In den Abbildung 47 und Abbildung 48 wurden bereits mögliche Konformationen oxidiert La Proteine vorgestellt. Weitere Belege für die Umfaltungen auf Sekundärstrukturebene, die gleichzeitig Voraussetzung für die Entstehungen der oxidierten La Konformere darstellten, fanden sich in den Ergebnissen der CD-Spektroskopie. Dabei wiesen die vier untersuchten La Proteine schon untereinander abweichende, prozentuale Anteile von α -Helices auf. Diese Anteile wurden in den La Proteinen mit einem Cystein an Position 18 (La wt und La_{C232A_C245A}) in Anwesenheit von Cu(II)SO₄ nochmals stark reduziert. Damit konnte eindeutig der Einfluss der Cysteine und eines oxidierenden Milieus auf die Sekundärstruktur des La Proteins belegt werden. Es kristallisierte sich heraus, dass die reduzierte Konformation des Proteins, welche im Zellkern vorkommt, die energetisch günstigere darstellt. Durch Oxidation kommt es scheinbar zu einer Veränderung der Sekundärstruktur und wahrscheinlich zu Spannungen im Molekül, sodass eine Stabilisierung dieser Konformation nur durch Disulfidbrücken möglich ist.

Daneben wurde auch der Einfluss auf die Bindung von Nukleinsäuren, maßgeblich RNS und DNS-RNS-Hybride, untersucht. Aus den Immunoblotanalysen von Abbildung 44 wurde ersichtlich, dass Nukleinsäuren besonders gut durch reduziertes La Protein gebunden wurden. La Proteine, die jedoch über ihre Cysteine oxidiert werden konnten, wie La wt, La_{C18A} und La_{C232A_C245A}, zeigten nach Oxidation eine verminderte

Nukleinsäurebindung. Dazu passten auch die Ergebnisse der UV-Spektrenanalysen aus Abbildung 43. Sie zeigten deutlich, dass alle vier La Proteine nach der Reinigung assoziiert mit Nukleinsäuren vorlagen. Durch die Gegenwart von Nukleasen konnte der Nukleinsäureanteil in den Proben von La wt, La_{C18A} und La_{C232A_C245A} reduziert werden. Eine Ausnahme stellte die Tripelcysteinmutante La_{C18A_C232A_C245A} dar. Bei dieser Probe war ein Nukleinsäureverdau bei pH 7,0 (unter physiologischen Bedingungen) nicht erfolgreich. Dieses Ergebnis wurde als möglicher Nukleinsäureschutz vor Nukleasen durch reduziertes La Protein interpretiert. Der Nukleinsäuregehalt der Tripelcysteinmutantenprobe konnte erst durch das Wirken von RNaseA bei pH 4,5, ähnlich wie im Lysosomen von Makrophagen und DCs, vermindert werden. Für die Erklärung der Beobachtungen und die Übertragung auf die potentielle Situation *in vivo* soll die Abbildung 50 behilflich sein.

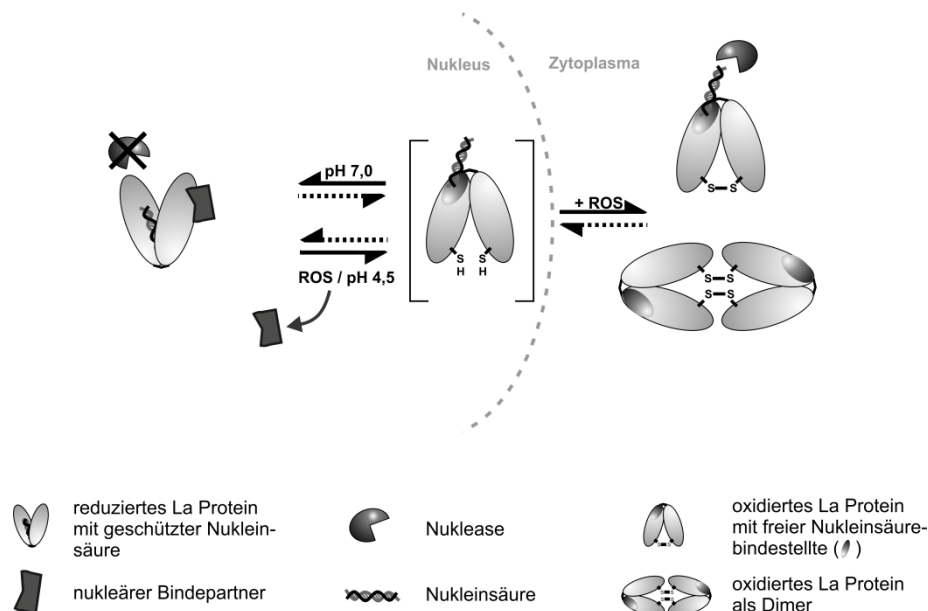


Abbildung 50: Schematische Darstellung der sich ändernden Nukleinsäurebindung durch das La Protein. Unter physiologischen Bedingungen liegt das La Protein reduziert im Zellkern vor, zurückgehalten durch den nukleären Bindepartner am NRE. Dabei schützt es die assoziierte Nukleinsäure in seinem Inneren. Durch den Einfluss von ROS, kommt es zur Trennung vom nukleären Bindepartner, zum Umfalten des La Proteins und zu dessen zytoplasmatischer Anreicherung. Nach der Stabilisierung der oxidierten Konformation, liegt die Nukleinsäurebindestelle nicht mehr versteckt im Inneren des La Proteins. Die gebundene Nukleinsäure könnte nun abdiffundieren und wäre für Nukleasen zugänglich. Die freien Nukleinsäurebindestellen von La wären nun für dessen Aufgaben im Zytoplasma frei verfügbar. *In vitro* zeigte die Tripelcysteinmutante, welche nicht durch ROS beeinflussbar war, ein vergleichbares Verhalten durch den Einfluss eines verminderten pH Werts von 4,5.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit zum La Protein, den Informationen aus der Literatur und unter Zuhilfenahme der Abbildung 50 lässt sich ein Szenario beschreiben, welches den Einfluss von oxidativem Stress auf die Struktur und die

zelluläre Funktion des La Proteins zusammenfasst. Das La Protein liegt zunächst unter physiologischen Bedingungen reduziert im Zellkern vor. Dort wird es zurückgehalten durch seinen nukleären Bindepartner am NRE. Darüber hinaus kann es RNS-Polymerase III-Transkripte über deren 3'-Oligouridinsequenzen (polyU) binden [42]. Unter den reduzierenden Bedingungen des Zellkerns, liegt die Nukleinsäurebindestelle versteckt im Inneren des La Proteins. Dadurch ist es in der Lage die RNS-Moleküle während ihrer Reifung vor Nukleasen zu schützen [62–66; 68–71]. Durch oxidativen Stress kommt es zu Veränderungen in der Sekundärstruktur des nukleären Bindepartners und im La Protein. Dies hat eine Trennung beider Moleküle zur Folge [54]. Darüber hinaus bedingt die Umfaltung des La Proteins die Freilegung der Nukleinsäurebindestelle, sowie die Translokation ins Zytoplasma. Inwiefern das La Protein mit oder ohne assoziierte Nukleinsäuren den Zellkern verlässt, ist noch ungeklärt. Durch die *in vitro* Arbeiten von Methews *et al.* 1984, Franceour *et al.* 1982 und Stefanno *et al.* 1984 ist nur bekannt, dass es nach der Reifung von RNS-Polymerase III-Transkripten zur Abspaltung des 3'-terminalen polyU-Restes kommt und dadurch die Assoziation zwischen dem La Protein und der Nukleinsäure aufgehoben wird [63–65; 85; 88]. Durch die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit kann jedoch angenommen werden, dass eine Oxidation des La Proteins und die daraus resultierende Umfaltung zum Verlust des Nukleinsäureschutzes führt. Liegt das La Protein im Zytoplasma in stabilisierter, oxidiert Konformation vor, so kann eine assoziierte Nukleinsäure leichter abdiffundieren und wäre durch Nukleasen des Zytoplasmas abbaubar. Die Nukleinsäurebindestelle des La Proteins wäre im Anschluss an einen solchen Vorgang wieder frei und das La Protein könnte andere Nukleinsäuren, wie zum Beispiel IRES-Elemente verschiedener mRNS Moleküle binden und deren Translation unterstützen [76–78; 145]. Dies schließt auch die IRES-vermittelte Translation viraler RNS ein. Craig *et al.* 1997 und Horke *et al.* 2000 fanden heraus, dass eine solche IRES-vermittelte Translation viraler RNS vor allem durch dimerisiertes La Protein begünstigt wird [44; 45; 80]. Auf Grund der gewonnenen Daten ist die Bildung zytoplasmatischer La Dimere anzunehmen, wie es auch in der schematischen Darstellung von Abbildung 50 gezeigt ist.

5.3 Einfluss von oxidativen Stress auf die zelluläre Lokalisation des La Proteins

5.3.1 Sauerstoffstressbedingte Induktion zytoplasmatischer La Anreicherung

Im Jahr 2010 zeigten Wang *et al.* [146], dass bei SLE oft erhöhte Mengen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) im Vergleich zu gesunden Probanden vorliegen. Die Korrelationen zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und SLE zeigten bereits Grune *et al.* 1997, Nuttall *et al.* 2003, Matsuura *et al.* 2008 und Morgen *et*

al. 2009 [141; 147–149]. Auslöser für die Entstehung von ROS in diversen Zellen waren unter anderem die Exposition gegenüber starker UV-Strahlung [96; 106], Virusbefall [97; 98; 150; 151], der Einfluss von IFN γ [152–154] und die Behandlung mit H₂O₂ [109]. Als eine Folge des Einflusses von Sauerstoffstress wurde in der Vergangenheit die zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins schon oft beschrieben. Dafür wurde häufig der Begriff des *Shuttlings* verwendet [53; 54].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterführende Studien zu dieser Problematik durchgeführt. Dafür wurden als Untersuchungsobjekte unter anderem 3T3 EGFP-La wt Zellen generiert. Mit diesen konnten die Einflüsse unterschiedlicher Stimuli wie H₂O₂, Cu(II)SO₄, Fe(II)Cl₂ und NO-Glutathion untersucht werden. Für alle diese Stimuli konnte eine zytoplasmatische La Anreicherung dokumentiert werden. Als Positivkontrolle und Vergleichsprobe zu den Analysen von C. Franke [109] wurde 0,5 % H₂O₂ als Stimulus für die zytoplasmatische La Anreicherung verwendet. Dies entsprach einer Konzentration von 160 mM. Bei einer Zellbehandlung mit einer derart hohen Dosis, sind die Resultate der entsprechenden Proben jedoch mit Vorsicht zu betrachten. In ähnlichen Studien von Kang *et al.* 2011 zum *Shuttling* des *High mobility group box 1* (HMGB1) Proteins wurde beschrieben, dass für eine zytoplasmatische HMGB1 Anreicherung in Fibroblasten 0,0125 – 0,125 mM H₂O₂ ausreichen würden. Über einen Zeitraum von 3 - 24 h führte es sogar zur aktiven Freisetzung des Proteins. H₂O₂ Konzentrationen größer als 0,25 mM resultierten in einer Mischung aus aktiver und passiver HMGB1 Freisetzung [155]. In noch höheren Dosen kann H₂O₂ zytotoxisch wirken [156; 157]. Für die verwendeten 3T3 Zellen schien die eingesetzte H₂O₂ Konzentration für den betrachteten Zeitraum von 20 Minuten nicht toxisch gewesen zu sein, denn während der mikroskopischen Analysen war kein Zellsterben zu beobachten. Allerdings schienen die slanDCs im Versuch von Abbildung 35 eine geringere Resistenz gegenüber der Wirkung von H₂O₂ zu haben, woraus die starke Verminderung der Zellzahl in der entsprechenden Probe und der Verlust der Quantifizierbarkeit resultierten.

Neben H₂O₂ können auch Cu²⁺ und Fe²⁺ Ionen oxidativen Stress in Zellen auslösen [158; 159]. Diese Ionen sind dann in der Regel Initiatoren der Fenton-Reaktion, wodurch Hydroxylradikale (OH \cdot) in den Zellen entstehen können. Hydroxylradikale zählen zu den ROS, die Einfluss auf intrazelluläre Prozesse nehmen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf Grund der Präsenz von Cu²⁺ und Fe²⁺ Ionen die zytoplasmatische Anreicherung von La initiiert werden konnte.

Neben dem Einfluss von ROS auf Proteine und DNS in SLE Patienten beschreiben Wang *et al.* 2010 [146] und Sing *et al.* 2000 [160] auch den Einfluss von reaktiven Stickstoffspezies (RNS). Ein Vertreter dieser Molekülgruppe ist Stickstoffmonoxid (NO), welches unter anderem durch die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) generiert werden

kann. NO in hohen Konzentrationen kann auch die Induktion von Apoptose und Nekrose induzieren [161]. Aus der Literatur ist darüber hinaus bekannt, dass in SLE Patienten erhöhte Konzentration an iNOS und RNS nachgewiesen werden konnten [162–166]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Versuche mit einem externen NO-Donor, in Form von NO-Glutathion, der Einfluss von reaktiven Stickstoffspezies auf das La Protein und seine intrazelluläre Lokalisation geprüft. Es zeigte sich für alle untersuchten Zelltypen eine zytoplasmatische Anreicherung des La Proteins nach 20 minütiger Inkubation in Medium mit NO-Glutathion. Das korreliert mit den Ergebnissen von Schörner 2000 [167], der eine zytoplasmatische Anreicherung von La Protein in 3T3 Zellen nach zwei-, vier-, acht-, zwölf- und vierundzwanzigstündiger Inkubation im Medium mit NO-Glutathion dokumentierte. Auch schloss Schörner eine Translokation auf die Zelloberfläche nicht aus, da bei einigen Zellen seiner Proben eine scheinbare Zelloberflächenfärbung durch den *anti-La* mAK 5B9 zu verzeichnen war. Derartige Färbungsergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Für keinen der untersuchten Zelltypen, unabhängig vom Sauerstoff- oder Stickstoffstresstimulus wurde eine Translokation des La Proteins auf die Zelloberfläche beobachtet.

Auf Grund der Kenntnisse bezüglich der Korrelationen von iNOS und SLE, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch eine rezeptorabhängige Beeinflussung des intrazellulären Levels an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) zur einer zytoplasmatischen La Anreicherung führen kann. Der potentiell zugrundeliegende Mechanismus einer solchen Reaktionskette wurde bereits in Abbildung 33 schematisch dargestellt. Als Untersuchungsobjekte dienten Zellen, welche über TLR verfügten, darunter HEK393T hTLR4, moDCs und slanDCs. Als Stimuli wurden LPS zur Aktivierung der Zellen über den TLR4 und Resiquimod® für die Stimulation über die TLR7/8 eingesetzt [135]. Es zeigte sich, dass Zellen mit TLR-Expression über dessen passenden Liganden zur zytoplasmatischen La Anreicherung stimuliert werden konnten. Dieser Sachverhalt wurde mit der vorliegenden Arbeit erstmals dokumentiert.

Eine Sonderrolle bei den Analysen zur zytoplasmatischen La Anreicherung nahmen die Endothelzellen (HUVECs) ein. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei den Studien 4.4.1.1 bis 4.4.1.4 war, unabhängig vom Stimulus, keine Anreicherung des La Proteins im Zytoplasma zu verzeichnen. Erst eine vorangeschaltete vierundzwanzigstündige Kultivierung mit Buthioninsulfoximin (BSO), einem Glutathionsynthesehemmer, führte schließlich zu beobachtbaren Anreicherungen von La im Zytoplasma der HUVECs in Kombination mit H₂O₂, Cu(II)SO₄, Fe(II)Cl₂, NO-Glutathion und LPS. Daher ließ sich vermuten, dass HUVECs über ein höheres Grundlevel an Glutathion (GSH) verfügten, um RONS zu beseitigen und deren Auswirkungen auf die Zelle zu vermindern. Durch die Inhibierung der Glutathionsynthese wurde ihre erhöhte Toleranzschwelle gegenüber

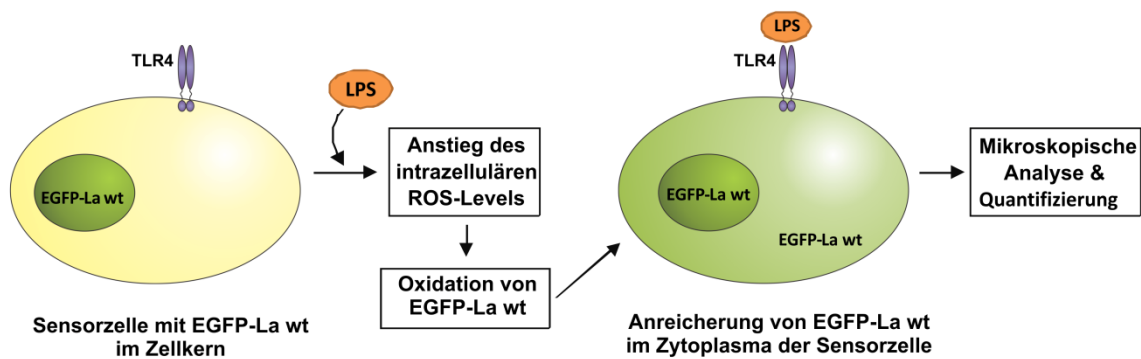
RONs herabgesetzt und die Auswirkungen wurden in der Translokation des La Proteins sichtbar. Eine derartige Betrachtungsweise der erlangten Erkenntnisse ist konform mit den in der Literatur dokumentierten Fakten zu Glutathion bei Autoimmunkrankheiten und SLE im Speziellen. Schon Perricone *et al.* beschrieben 2009 Glutathion als „*key player in autoimmunity*“. So wurde zum Beispiel eine generelle Glutathionreduktion bei SLE und Rheumatischer Arthritis beschrieben [152; 168]. Dies hätte eine verminderte Toleranz gegenüber RONS zur Folge, was in einer erhöhten Modifikationsrate von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen, inklusive der Entstehung von Neoantigenen [146; 152; 167] resultiert. Letztlich kann die verminderte Fähigkeit RONS zu neutralisieren auch zur Zerstörung von Lipiden, DNS und Proteinen und zur Induktion von Apoptose der betroffenen Zellen führen. Im Falle von SLE korrelieren diese Erkenntnisse mit einer beobachteten, erhöhten Apoptoserate und gesteigerten Entzündungsreaktionen [169–173].

5.3.2 Einführung eines potentiellen LPS-Sensorsystems

In der Pharmaindustrie werden inzwischen viele Proteine rekombinant mit Hilfe von *E. coli* Stämmen produziert. Daher ist es notwendig und gesetzlich vorgeschrieben, die Produkte auf Kontaminationen mit bakteriellen Endotoxinen, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS), zu prüfen. Früher wurde dies hauptsächlich im Tierversuch mit Kaninchen durchgeführt, inzwischen wurde dieser durch den sehr kostenintensiven Limulus-Amöbocyten-Lysat Test, kurz LAL-Test, ersetzt [174].

Durch die Ergebnisse zur rezeptorinduzierten, zytoplasmatischen La Anreicherung (siehe 4.4.1.3) ist es nun auch denkbar, ein neues Testsystem zu erarbeiten. Die Idee für solch ein potentielles LPS-Sensorsystem wird in Abbildung 51 (A) gezeigt. Dafür wäre eine Sensorzelle von Nöten, welche auf der Oberfläche den TLR4 und intrazellulär das Fusionsprotein EGFP-La wt exprimiert. Kommt es zur Bindung von LPS über den TLR4, führt das zum Anstieg intrazellulärer, reaktiver Sauerstoffäquivalente. Diese bedingen eine Oxidation des EGFP-La wt Proteins und führen letztlich zur zytoplasmatischen Anreicherung des Fusionsproteins. Die Sensorzelle zeigt somit ein zytoplasmatisches EGFP-Signal. Anschließend sollten die Proben fluoreszenzmikroskopisch analysiert und quantifiziert werden. Die Prüfung dieser Idee erfolgte in einem ersten kleinen Versuch. Dafür wurden HEK293T hTLR4 Zellen mit EGFP-La wt transduziert und deren EGFP-La wt Lokalisation nach Inkubation in DMEM_{Standard} mit 0,05 mM LPS geprüft. Die Resultate der quantifizierten fluoreszenzmikroskopischen Analysen sind in Abbildung 51 (B) gezeigt.

A Prinzip eines LPS-Sensorsystems (Schematischen Darstellung)



B La-Anreicherung im Zytoplasma eines Prototyps für ein LPS-Sensorsystem

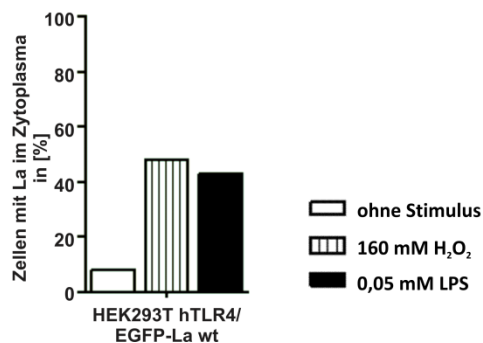


Abbildung 51: Das Prinzip eines potentiellen LPS-Sensorsystems basierend auf einer rezeptorinduzierten, zytoplasmatischen EGFP-La wt Anreicherung. In (A) ist die schematische Darstellung des Prinzips eines potentiellen LPS-Sensorsystems gezeigt. (B) Für die Überprüfung der Idee zum LPS-Sensorsystem wurden HEK293T hTLR4 Zellen mit p6NST50 EGFP-La wt transduziert, für eine stabile Expression des Fusionsproteins EGFP-La wt. Die entstandenen HEK293T hTLR4/EGFP-La wt Zellen wurden mit 0,05 mM LPS stimuliert, das EGFP-Signal fluorezenzmikroskopisch analysiert, quantifiziert und grafisch aufgearbeitet (schwarzer Balken im Diagramm). Die Resultate wurden mit der zytoplasmatischen La Anreicherung unstimulierter Zellen (weiß, Negativkontrolle) und 160 mM H₂O₂ behandelter Zellen (längsgestreift, Positivkontrolle) verglichen.

Aus dem Versuch wurde ersichtlich, dass die erzeugten HEK293T hTLR4/EGFP-La wt Zellen als Prototyp für ein potentielles LPS-Sensorsystem funktionell waren. Durch die Inkubation mit LPS wurde in 40 % der Zellen eine zytoplasmatische Anreicherung von EGFP-La wt beobachtet. Diese entsprach in etwa dem Ergebnis, welches durch die Positivkontrolle, Zellen mit H₂O₂ Behandlung, erreicht wurde. Beide Proben zeigten damit einen deutlich höheren prozentualen Anteil von Zellen mit EGFP-La wt im Zytoplasma, als die Negativkontrolle mit unstimulierten Zellen (etwa 10 %).

Die hier eingeführte Idee scheint laut der erhaltenen Daten prinzipiell funktionell zu sein. Für eine wirkliche Nutzung eines solchen Systems wären jedoch noch viele Optimierungen notwendig und Erweiterungen wünschenswert. Diese standen jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit und wurden daher auch nicht weiter verfolgt.

5.3.3 Das La Protein und seine Translokation auf die Zelloberfläche

Nachdem in den Studien im Kapitel 4.4.1 unter den gewählten Bedingungen keine Translokation des La Proteins auf die Oberfläche lebender Zellen zu beobachten war, sollte geklärt werden, ob sterbende Zellen, apoptotische oder nekrotische Zellen, als potentieller La-Donor in Frage kommen könnten. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass La auf und in *apoptotic bodies* nachzuweisen war [175; 176]. Es wurde jedoch bezweifelt, dass sich La Protein auch von deren Oberfläche lösen könnte und auf lebende Nachbarzellen binden könnte. Stattdessen stand die Vermutung im Raum, dass lösliche La-RNP, als Resultat einer Nekrose, für die Dekoration lebender Zellen mit La Protein in Frage kämen.

Zuvor wurde jedoch generell geprüft, wie gut oxidiertes La Protein im Vergleich zu reduziertem La auf die Oberflächen verschiedener Zelltypen binden kann. Dabei stellte sich heraus, dass beide Redoxkonformationen des Proteins mit ähnlicher Affinität binden können. Jedoch schien es für oxidiertes La Protein mehr verfügbare Bindestellen zu geben. Eine schlüssige Erklärung lässt sich für diese Beobachtung auch nach ausgiebiger Literaturrecherche bisher noch nicht finden. Mutmaßlich könnten Unterschiede in der Assoziation von La wt Di- und Oligomeren begründet liegen. Aber auch die Interaktion von Nukleinsäuren mit reduziertem und oxidiertem La Protein und deren Einfluss auf die Zelloberflächenbindung könnte eine Rolle spielen.

Eine weitere Beobachtung bezüglich der Oberflächenbindung von La konnte zwischen den untersuchten Zelltypen dokumentiert werden. So zeichneten sich Monozyten und Radji Zellen, als Vertreter von APCs, sowie Endothelzellen und murine Fibroblasten durch eine hohe Anzahl an La Bindestellen aus. T- und NK-Zellen ließen sich hingegen nur schwer mit La Protein dekorieren, wodurch auf eine vergleichsweise niedrigere Anzahl von La Bindestellen geschlossen wurde. Eventuell liegt dies in den unterschiedlichen Eigenschaften von Zellmembranen adhärenter Zellen beziehungsweise von Suspensionzellen begründet. Deutlich wurde aus den Versuchen jedoch die Erkenntnis, dass vor allem oxidiertes La Protein sehr gut auf APCs und Gewebszellen, wie Endothelzellen und Fibroblasten, binden kann und somit bei einem SLE Patienten zugänglich für *anti-La* Antikörper wird.

Im Kapitel 4.4.2.4 wurde apoptotisches und nekrotisches Zellmaterial als potentielle La-Quelle untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur mit Hilfe von nekrotischem Zellmaterial eine deutliche La Dekoration lebender Zellen erreicht werden konnte. Die Unterschiede zu unbehandelten Zellen oder Zellen, die mit apoptotischen Zellmaterial inkubiert worden waren, stellten sich als signifikant heraus. Damit korrelierten die gewonnen Daten mit den Ansichten von Wu *et al.* 2001, die die sekundäre Nekrose als

Quelle proteolytisch modifizierter Varianten, spezifischer, intrazellulärer Antigene ansahen [177].

5.4 Das La Protein und die Aktivierung von DCs

In den finalen Analysen der hier zugrundeliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern oxidiertes und reduziertes La Protein in der Lage war, slanDCs zur Sekretion von TNF α zu stimulieren. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl oxidiertes als auch reduziertes La Protein slanDCs aktivieren. Eine verminderte TNF α Sekretion war nur bei Inkubation von slanDCs mit La Proteine ohne assoziierte Nukleinsäuren beziehungsweise vermindertem Nukleinsäuregehalt zu beobachten. Das bedeutet, käme es im SLE Patienten zur Aufnahme von La nach sekundärer Nekrose durch DCs, dann wäre deren Aktivierung nicht auf das La Protein selbst, sondern auf die in löslichen La-RNPs assoziierten Nukleinsäuren zurückzuführen. Daraus ließe sich auch schlussfolgern, dass zu beobachtende Sekretionen von TNF α und IFN γ vermutlich auf Nukleinsäure basierender TLR Induktionen zurückzuführen wäre.

Bei dem Versuch La Protein vor der Zugabe zu slanDCs in Serum von SLE Patienten oder gesunden Spendern zu inkubieren, stellte sich folgendes heraus. War das La Protein vor dem eigentlichen Versuch in SLE Patientenserum inkubiert worden, so war anschließend eine nur im geringen Maße verminderte TNF α Sekretion dokumentierbar im Vergleich zur slanDCs Stimulation mit unbehandeltem La Protein. Dem gegenüber zeigten slanDCs in Anwesenheit von La Protein, nach Inkubation in gesundem Spenderserum, eine deutlich verminderte TNF α Sekretion. Daraus wurde geschlossen, dass im Serum gesunder Spender aktive Nukleasen vorlagen, die den Nukleinsäuregehalt der Probe rekombinanten La Proteins vermindern konnten. Beispiele für solche Nukleasen sind DNase I [143] und RNase-H2 [178]. Hier wurde letztlich eine geringere TNF α Sekretion als Zeichen einer verminderten slanDC Aktivierung dokumentiert. Ein solcher Effekt war im Fall der Behandlung von La mit SLE Seren nicht zu beobachten. Dadurch wurde auf eine verminderte Nukleaseaktivität in den SLE Seren geschlossen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den in der Literatur gefundenen Hinweisen zu Nukleasedefekten bei SLE Patienten [143; 144; 178].

5.5 Verfeinertes Modell zur Induktion von einer Immunantwort durch La Protein und Autoantikörper

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war es, die gewonnenen Erkenntnisse in ein Modell zur Entstehung einer Immunantwort einzubinden, welche durch die Präsenz von Autoantikörpern und des La Proteins charakterisiert ist. Damit sollten verschiedene

Fragen geklärt werden: Wie kann ein nukleäres Protein zum Autoantigen werden und zur Entstehung einer Autoimmunantwort führen, wie zum Beispiel bei SLE oder dem Primären Sjögren's Syndrom? Auf welche Weise können darüber hinaus weitere nukleäre Komponenten, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, für die Entstehung von Autoantikörpern zugänglich werden? Ein solches Modell ist in Abbildung 52 dargestellt. Ausgangspunkt der Betrachtung ist eine sterbende Zelle, welche auf Grund von oxidativem Stress bereits La Protein im Zytoplasma angereichert hat. Ursache dafür könnten zum Beispiel eine starke UV-Exposition oder ein Befall durch einen Virus sein. Durch einen weiteren Anstieg von ROS wird die Apoptose der Zelle eingeleitet, wodurch die Zelle stirbt und *apoptotic bodies* entstehen. Durch Cascida-Rosen *et al.* 1994 und Schiller *et al.* 2008 ist bereits bekannt, dass La auf und in *apoptotic bodies* auftreten kann [175; 176]. Auch in Daten der AG um Herrn Prof. Bachmann konnte gezeigt werden, dass sich das La Protein auf der Oberfläche apoptotischer Zellen und *apoptotic bodies* detektieren lässt [54; 90; sowie in bisher unveröffentlichten Daten]. Unter physiologischen Bedingungen werden die *apoptotic bodies* durch Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) endozytiert und beseitigt. Das La Protein könnte zu diesem Zeitpunkt noch mit vormals nukleären Nukleinsäuren aus der somatischen Zelle assoziiert vorliegen. Falls diese nicht schon durch die Nukleasen während der Apoptose, wie zum Beispiel dem *DNA fragmentation factor* (DFF) abgebaut wurde. Doch spätestens im Lysosomen der Makrophage oder DC käme es wahrscheinlich zu einer pH-Wert bedingten Dissoziation beider Komponenten. Die frei werdende Nukleinsäure könnte dann von lysosomalen Nukleasen abgebaut werden und auch das körpereigene La Protein würde prozessiert werden. Dadurch käme es unter physiologischen Bedingungen zur Vermeidung einer Aktivierung der endozytierenden Zelle und der Einleitung einer Immunantwort gegen ungefährliche, körpereigene Strukturen. Trat die Apoptose der somatischen Zelle auf Grund einer Virusinfektion ein, so kann davon ausgegangen werden, dass das zytoplasmatische, oxidierte La Protein teilweise mit viralen Nukleinsäuren assoziiert vorliegt. Anschließend käme es zur Endozytose von *apoptotic bodies* durch DCs, gefolgt von der Dissoziation des La Proteins und der viralen, in der Regel Nuklease-resistenteren Nukleinsäure im Lysosomen. Diese Nukleinsäuren würden dann zur Stimulierung von lysosomalen *Toll-like* Rezeptoren (dsRNS → TLR3, ssRNS → TLR7/TLR8) führen. Deren Stimulation resultiert über den NFκB-Signalweg in der Aktivierung der Makrophage oder DC und damit in einer antiviralen Immunantwort. Unter diesen Umständen könnte man das La Protein daher als eine Art Fänger und Präsentator für virale Nukleinsäuren bezeichnen, ähnlich einem *scavenger receptor*.

Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie im Patienten mit SLE oder Primären Sjögren's Syndrom kommt es auf Grund verschiedener Faktoren zu teilweise starken

Veränderungen im Vergleich zu den Abläufen unter physiologischen Bedingungen. Erste entscheidende Faktoren sind die generelle Glutathionreduktion [152; 168] und das erhöhte Aufkommen von iNOS, sowie NO [163–166], welche alle zu einer stark verminderten RONS Toleranz und gesteigerten Apoptoserate bei SLE führen [169–173; 179]. Ein weiterer entscheidenden Faktor ist der Defekt in Makrophagen, welcher die Fähigkeit zur Beseitigung von *apoptotic bodies* stark einschränkt [7; 8; 180–182]. Auf Grund dessen, kommt es zur Entstehung von sekundären Nekrosen [9; 10; 183]. Folge dieser ist eine große Menge frei gelöster ehemals nuklearer Zellbestandteile, darunter auch RNPs inklusive La und Ro Proteinen, sowie Nukleinsäuren. An dieser Stelle wird der Einfluss eines weiteren Defekts bei SLE Patienten deutlich. In der Literatur ist beschrieben, dass bei SLE Patienten eine geringere DNase I Aktivität beobachtet wurde [144; 143; 184]. Bei der DNase I handelt es sich um die Hauptnuklease im Serum und im Urin eines Menschen. Fehlt diese im SLE Patienten kann die durch sekundäre Nekrose im Serum vorliegende somatische DNS nicht abgebaut werden und darum leicht mit La- und Ro-RNPs größere Komplexe bilden. Diese Komplexe können anschließend auf lebende Nachbarzellen binden und dendritische Zellen aktivieren. Beides konnte durch die Studien der hier vorliegenden Arbeit belegt werden, siehe Kapitel 4.4.4.

Dendritische Zellen würden die großen Komplexe aus nukleären Proteinen und Nukleinsäuren durch Endozytose aufnehmen. Im Lysosomen käme es zur Prozessierung des La Proteins. Gleichzeitig würde es auf Grund des Mangels an Nukleasen zur Stimulation der lysosomalen TLR und somit zur Aktivierung der DC kommen. Die Aktivierung wäre nicht nur durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IFN γ und Leukinen, sondern auch durch die Aufregulation MHC-II Molekülen gekennzeichnet [1; 153; 184]. Diese wären dann in der Lage, Fragmente prozessierter, ehemals nukleärer Proteine, wie zum Beispiel La und Ro, auf der Oberfläche der DC zu präsentieren. Nun kann es zum Kontakt dieser dendritischen Zellen mit einer T-Zelle kommen. Erkennt deren T-Zellrezeptor die MHC-II Moleküle mit den Fragmenten des La Proteins, so wird diese T-Zelle zur Reifung und Proliferation aktiviert werden. Das Resultat wäre die Entstehung eines großen *Pools* autoreaktiver T- Zellen (CD4⁺ T-Zellen) [185] die wiederum autoreaktive B-Zellen aktivieren können [186]. Jene B-Zellen haben dann ebenso die Chance zu proliferieren und zu Autoantikörper (*anti-La* AK) produzierenden Plasmazellen zu reifen. Bei SLE Patienten ist die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von aktivierten autoreaktiven T-Zellen und potentiell autoreaktiven Vorläufer-B-Zellen höher als im Vergleich zu Menschen ohne SLE. Yurasov *et al.* veröffentlichten 2005 Studien, welche Hinweise auf Defekte bei der Eliminierung autoraktiver Vorläufer-B-Zellen bei SLE gaben. Im Rahmen ihrer Studien konnten sie außerdem zeigen, dass 25 – 50 % der reifen naiven B-Zellen von SLE Patienten schon

Autoantikörper produzieren, bevor sie überhaupt an einer Immunantwort beteiligt waren, im Vergleich zu den 5 – 20 % der Kontrollgruppe [187].

Existieren nach solchen Prozessen, wie eben beschrieben, nun hohe Konzentrationen von ANAs im Serum eines SLE Patienten, so kann das verschiedene Auswirkungen haben. So können diese Antikörper große Immunkomplexe mit den im Serum vorhandenen RNPs bilden. Solche Immunkomplexe würden zum Verschluss kleinster Gefäße führen und zur Aktivierung von Entzündungsreaktionen über das Komplementsystem [1; 6]. Auch würden Zellen durch diese Autoantikörper erkannt werden, auf deren Oberfläche das La Protein, vermutlich in Kombination mit Nukleinsäuren, gebunden hat. Dadurch wären die Zellen nicht nur für eine komplement-systemgestützte Immunantwort markiert, sondern auch für eine Lyse durch NK-Zellen. Diese NK-Zellen können über ihren Fc-Rezeptor die ANAs auf den La dekorierten Zellen erkennen und dementsprechend eine *antibody derived cell cytotoxicity*, kurz ADCC, vermitteln [1]. Resultat dieser Zelleliminierung wären weitere Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden [7; 188] bis hin zu chronischen Entzündungen, wie sie bei SLE und Sjögren's Syndrom Patienten beobachtet werden können [3; 6]. Damit würden ANAs gegen das La Protein und wahrscheinlich auch gegen Ro60 und Ro52, sowie gegen Nukleinsäuren pathophysiologisch relevant für SLE oder Sjögren's Syndrom Patienten werden, was bisher teilweise noch in Frage gestellt wurde.

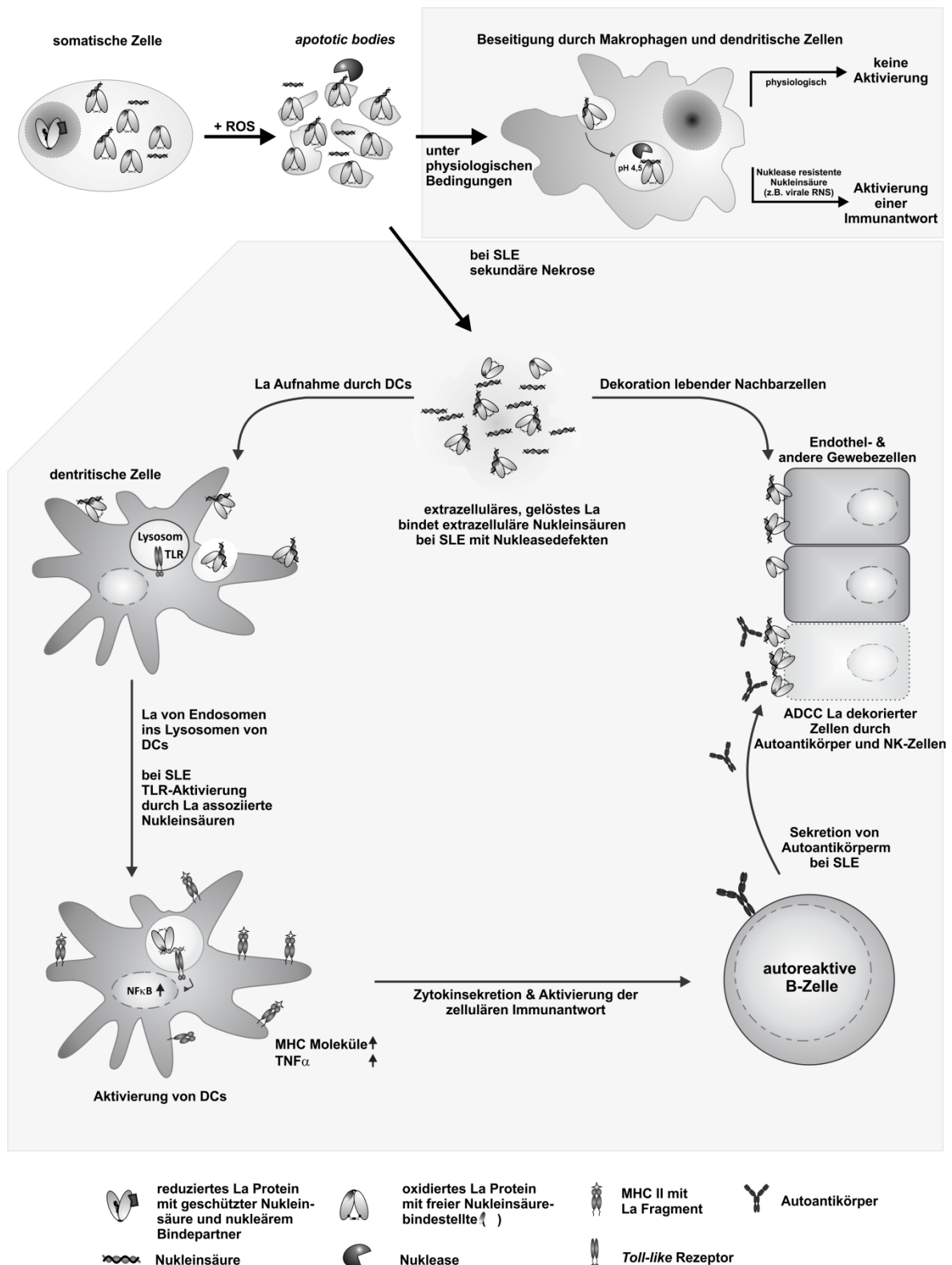


Abbildung 52: Schematische Darstellung eines Modells zur Entstehung einer Immunantwort durch das La Protein und Autoantikörper. Ausgangspunkt stellt eine sterbende, in Apoptose gehende, somatische Zelle dar. Der Kasten oben rechts, zeigt den weiteren, potentiellen Weg des La Proteins unter physiologischen Bedingungen. Der untere Kasten soll die Abläufe unter pathophysiologischen Bedingungen bei SLE Patienten zusammenfassen.

6. Literatur

- [1] **Janeway, C.;** Travers, P.; Walport, M. und Sholmichik, M.: *Immunologie* (2002), Auflage 5, Spektrum Akademischer Verlag GmbH (Heidelberg, Berlin).
- [2] **Kleinert, S.;** Feuchtenberger, M. und Tony, H.-P.: *Systemischer Lupus erythematoses - Eine problemorientierte Annäherung*. Der Internist (2010), 51, Seite 1013–1028, DOI 10.1007/s00108-010-2682-6.
- [3] **Ramos-Casals, M.;** Brito-Zeron, P.; Siso-Almrial, A. und Bosch, X.: *Primäres Sjögren-Syndrom*. Praxis (2012), 24 (101), Seite 1565–1571, DOI 10.1024/1661-8157/a001133.
- [4] **Mattioli, M. und Reichlin M.:** *Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism (1974), 4 (17), Seite 421–429, DOI 10.1002/art.1780170413.
- [5] **Clark, G.;** Reichlin, M. und Tomasi JR, T.B.: *Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus*. Journal of Immunology (1969), 1 (102), Seite 117–122.
- [6] **Schulz, O.;** Editors: Michels, G.; Schneider, T.: *Klinikmanual Innere Medizin* (2010), Springer (Berlin Heidelberg), Kapitel: Kollagenosen, Seiten: 575-585, ISBN: 3-540-89109-9.
- [7] **Schulze, C.;** Munoz, L.; Franz, S.; Sarter, K.; Chaurio, R.G.U. und Hermann, M.: *Clearance deficiency: a potential link between infections and autoimmune response to RNP*. Autoimmunity Reviews (2008), 1 (8), Seite 5–8.
- [8] **Arbuckle, M.;** McClain, M.; Rubertone, M.; Scofield R.H.; Dennis, G.; James, J. und Harley, J.B.: *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. New England Journal of Medicine (2003), 349, Seite 1526–1533.
- [9] **Köhler, G. und Milstein C.:** *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature (1975), 256, Seite 495–497.
- [10] **Alspaugh, M.A. und Tan E.M.:** *Antibodies to cellular antigens in sjögren's syndrome*. Journal of Clinical Investigation (1975), 5 (55), Seite 1067–1073.
- [11] **Conrad, K.;** Schößler, W. und Hiepe, F.: *Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Ein diagnostischer Leitfaden*. (2006), Auflage 2, Pabst Science Publishers (Lengerich), ISBN: 3899673506.
- [12] **Kappelhoff, P.;** Schünke, U. und Lochmann, G.: *ANA - Antinukleäre Antikörper*. LabmedLetter (2012), 108, Seite 1–2.
- [13] **Reichlin, M. und Mattioli M.:** *Correlation of a precipitin reaction to an RNA-protein antigen and a low prevalence of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus*. New England Journal of Medicine (1972), 286, Seite 908–911, DOI 10.1056/NEJM197204272861702.
- [14] **Lerner, M.R. und Steitz J.A.:** *Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus*. PNAS (1979), 11 (76), Seite 5495–5499.
- [15] **Gottlieb, E. und Steitz J.A.:** *The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro*. EMBO Journal (1989), 8, Seite 841–850.
- [16] **Scherly, D.;** Stutz, F.; Lin Marq, N. und Clarkson, S.G.: *La proteins from X. leavis: cDNA cloning and developmental expression*. Journal of Molecular Biology (1993), 231, Seite 196–204, DOI 10.1006/jmbi.1993.1275.
- [17] **Topfer, F.;** Gordon, T. und McCluskey, J.: *Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant proteins with poly(U) and human autoantibodies*. Journal of Immunology (1993), 150, Seite 3091–3100.

-
- [18] **Semsei, I.**; Tröster, H.; Bartsch, H.; Schwemmle, M.; Igloi, G. und Bachmann, M.: *Isolation of rat cDNA clones coding for the autoantigen SS-B/La: detection of species-species variations*. *Gene* (1993), 126, Seite 265–268.
- [19] **Pruijn, G.M.**; Thijssen, J.; Smith, P.; Williams, D. und van Venrooij, W.J.: *The La(SS-B) antigen*. In *manual of biological markers of diseases*. W.J. van Venrooij and R.N. Maini, eds. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers) (1994) Seite B4.2/1–B4.2/14.
- [20] **Yoo, C.J.** und Wolin S.L.: *La proteins from D. melanogaster and S. cerevisiae: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth*. *Molecular and Cellular Biology* (1994), 8 (14), Seite 5412–5424, DOI 10.1128/MCB.14.8.5412.
- [21] **Lin-Marq, N.** und Clarkson, S. G.: *A yeast RNA binding protein that resembles the human autoantigen La*. *Journal of Molecular Biology* (1995), 245, Seite 81–85.
- [22] **Bai, C.** und Tolias P.P.: *Developmental characterization of a Drosophila RNA-binding protein homologous to the human system lupus erythematosus-associated La/SS-B autoantigen*. *Molecular and Cellular Biology* (1994), 8 (14), Seite 5123–5129, DOI 10.1128/MCB.14.8.5123.
- [23] **Wolin, S.** und Cederval, T.: *The La protein*. *Annals Reviews of Biochemistry* (2002), 71, Seite 375–403, DOI 10.1146/annurev.biochem.71.090501.150003.
- [24] **Park, J.-M.**; Kohn, M.J.; Bruinsma, M.W.; Vech, C.; Intine, R.V.; Fuhrmann, S.; Grinberg, A.; Mukherjee, I.; Love, P.E.; Ko, M.S.; DePamphilis, M.L. und Maraia, R. J.: *The multifunctional RNA-binding protein La is required for mouse development and for the establishment of embryonic stem cells*. *Molecular and Cellular Biology* (2006), 4 (26), Seite 1445–1451, DOI 10.1128/MCB.26.4.1445–1451.2006.
- [25] **Chambers, J.**; Kenan, D.; Martin, B. und Keene, J.D.: *Genomic structure and aminoacid sequence domains of La autoantigen*. *Journal of Biological Chemistry* (1983), 263, Seite 11438–11441.
- [26] **Tröster, H.**; Metzger, T.E.; Semsei, I.; Schwemmle, M.; Winterpacht, A.; Zabel, B. und Bachmann, M.: *One Gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary sjögrens' syndrome*. *Journal of Experimental Medicine* (1994), 180, Seite 2059–2067.
- [27] **Bachmann, M.**; Grölz, D.; Bartsch, H.; Klein, R. und Tröster, H.: *Analysis of expression of an alternative La(SS-B) cDNA and localization of the encoded N- and C-terminal peptides*. *Biochemica et Biophysica Acta* (1997), 1356, Seite 53–63.
- [28] **Grölz, D.**; Tröster, H.; Semsei, I. und Bachmann, M.: *Analysis of expression of the gene encoding for the nuclear autoantigen La/SS-B using reporter gene constructs*. *Biochemica et Biophysica Acta* (1998), 1396, Seite 278–293.
- [29] **Grölz, D.**; Laubinger, L.; Wilmer, F.; Tröster, H. und Bachmann, M.: *Transfection analysis of expression of mRNA isoforms encoding the nuclear autoantigen La/SS-B*. *Journal of Biological Chemistry* (1997), 272, Seite 12076–12082, DOI 10.1074/jbc.272.18.12076.
- [30] **Bachmann, M.**; Tröster, H.; Bartsch, H. und Grölz, D.: *A frame shift mutation in a hot spot region of the nuclear autoantigen La (SS-B)*. *Journal of Autoimmunity* (1996), 9, Seite 747–756.
- [31] **Bousquet-Antonelli, J.** und Deragon J.-M.: *A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily*. *RNA* (2009), 15, Seite 750–764, DOI 10.1261/rna.1478709.
- [32] **Bayfield, M.**; Yang, R. und Maraia, R.J.: *Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs)*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* (2010), 5-6 (1799), Seite 365–378, DOI 10.1016/j.bbagr.2010.01.011.
- [33] **Pizer, L.**; Deng, J.-S.; Steinberg, R. und Tan, E.M.: *Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in Adeno virus-infected and uninfected KB cells*. *Molecular and Cellular Biology* (1983), 3 (7), Seite 1235–1245, DOI 10.1128/MCB.3.7.1235.
-

-
- [34] **Francoeur, A.;** Chan, E.; Garrels, J. und Methews, M.B: *Characterization and purification of lupus antigen La, an RNA-binding protein*. Molecular and Cellular Biology (**1985**), 5 (3), Seite 586–590, DOI 10.1128/MCB.5.3.586.
 - [35] **Broekhuis, C.;** Neubauer, G.; van der Heijden, A.; Mann, M.; Proud, C.; van Venrooij, W. und Pruijn, G.J.M: *Detailed analysis of the phosphorylation of the human La (SS-B) autoantigen. (De)phosphorylation does not affect its subcellular distribution*. Journal of Biochemistry (**2000**), 33, Seite 2023-2033.
 - [36] **Fan, H.;** Sakulich, A.; Goodier, J.; Zhang, X.; Qin, J. und Maraia, R.J: *Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes*. Cell (**1997**), 5 (88), Seite 707–715, DOI 10.1016/S0092-8674(00)81913-3.
 - [37] **Alfano, C.;** Sanfelice, D.; Babon, J.; Kelly, G.; Jacks, A.; Curry, S. und Conte, M.R: *Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein*. Nature Structural & Molecular Biology (**2004**), 4 (11), Seite 323–329, DOI 10.1038/nsmb747.
 - [38] **Jacks, A.;** Babon, J.; Kelly, G.; Manolaridis, I.; Cary, P.; Curry, S. und Conte, M.R: *Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element*. Structure (**2003**), 7 (11), Seite 833–843, DOI 10.1016/S0969-2126(03)00121-7.
 - [39] **Gajiwala, K.S.** und Burley, S. K.: *Winged helix proteins*. Current Opinion in Structural Biology (**2000**), 1 (10), Seite 110–116, DOI 10.1016/S0959-44X(99)00057-3.
 - [40] **Dong, G.** und Chakshusmathi, G. Wolin S.L. Reinisch K.M: *Structure of the La motive: A winged helix domain mediates RNA binding va a conserves aromatic patch*. EMBO Journal (**2004**), 5 (23), Seite 1000–1007.
 - [41] **Maris, C.;** Dominguez, C. und Allain, F.H.-T: *The RNA recognition motive, a plastic RNA-binding platform to regulate post-translational gene expression*. FEBS Journal (**2005**), 9 (272), Seite 2118–2131.
 - [42] **Teplova, M.;** Yuan, Y.-R.; Phan, A.; Malinina, L.; Ilin, S.; Teplov, A. und Patel, D.J: *Structural basis for recognition and sequestration of UUUOH 3' temini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen*. Molecular Cell (**2006**), 1 (21), Seite 75–85, DOI 10.1016/j.molcel.2005.10.027.
 - [43] **Kotik-Kogan, O.;** Valentine, E.; Sanfelice, D.; Conte, M. und Curry, S.: *Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein*. Structure (**2008**), 6 (16), Seite 852–862.
 - [44] **Craig, A.;** Svitkin, Y.; Lee, H.; Belsham G.J. und Sonenberg, N.: *The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation*. Molecular and Cellular Biology (**1997**), 17, Seite 163–169.
 - [45] **Horke, S.;** Reumann, K.; Rang, A. und Heise, T.: *Moluecular characterization of the human La protein-hepatitis B virus RNA interaction in vitro*. Journal of Biological Chemistry (**2002**), 38 (277), Seite 34949–34958.
 - [46] **Elad, N.;** Maimon, T.; Frenkiel-Krispin, D.; Lim, R. und Medalia, O.: *Structural analysis of the nuclear pore complex ba integrated aproaches*. Current Opinion of Structoral Biology (**2002**), 2 (19), Seite 226–232.
 - [47] **Moroianu, J.;** Blobel, G. und Radu, A.: *Nuclear protein import: Ran-GTP dissociated the karyopherin alpha-beta herterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta*. PNAS (**1996**), 93, Seite 7059–7062.
 - [48] **Dingwall, C.;** Sharnick, S. und Laskey, R.A: *A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus*. Cell (**1982**), Vol. 30, Seite 449–458.
 - [49] **Boulikas, T.:** *Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors*. Journal of Cellular Biochemistry (**1994**), 55, Seite 32–58.
 - [50] **Dingwall, C.** und Laskey R.A.: *Nuclear targeting sequences - a consensus?* Elsvier Science Publishers (**1991**), 16, Seite 478–481.
-

-
- [51] **Fukuda, M.**; Asano, S.; Nakamura, T.; Adachi, M.; Yoshida, M.; Yanagida, M. und Nishida, E.: *CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal*. Nature (1997), 390, Seite 308–311.
- [52] **Sorokin, A.**; Kim, E. und Ovchinnikov, L.P.: *Nucleocytoplasmic transport of proteins*. Journal of Biochemistry (2007), 13 (72), Seite 1439–1457.
- [53] **Bachmann, M.**; Pfeifer, K.; Schröder, H. und Müller, W.E.G.: *The nucleocytoplasmic shuttling of the La antigen in CV-1 cells*. Journal of General Virology (1987), 3 (12), Seite 239–240.
- [54] **Bachmann, M.**; Falke, D.; Schröder, H.-C. und Müller W.E.G.: *Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after herpes simplex virus type 1 infection compared with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles*. Journal of General Virology (1989), 70, Seite 881–891.
- [55] **Simons, F.**; Broers, F.J.; van Venrooij, W. und Pruijn, G.J.M.: *Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen*. Experimental Cell Research (1996), 224 (2), Seite 224–236.
- [56] **Intine, R.**; Dundr, M.; Misteli, T. und Maraia, R.J.: *Aberrant nuclear trafficking of La Protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs*. Molecular Cell (2002), 5 (9), Seite 1113–1123.
- [57] **Bayfield, M.**; Kaiser, T.; Intine, R. und Maraia, R.J.: *Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation*. Molecular and Cellular Biology (2007), 9 (27), Seite 3303–3312.
- [58] **Horke, S.**; Reumann, K.; Schweizer, M.; Will, H. und Heise, T.: *Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA*. Journal of Biological Chemistry (2004), 25 (279), Seite 26563–26570.
- [59] **Schwartz, E.**; Intine, R. und Maraia, R.J.: *CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate rpL37 5'-terminal oligopyrimidine mRNA metabolism*. Molecular and Cellular Biology (2004), 21 (24), Seite 9580–9591, DOI 10.1128/MCB.24.21.9580–9591.2004.
- [60] **Naeeni, A.R.**; Conte, M. und Bayfield, M.A.: *RNA chaperone activity of human La protein is mediated by variant RNA recognition motif*. Journal of Biological Chemistry (2012), 8 (287), Seite 5472–5482, DOI 10.1074/jbc.M111.276071.
- [61] **Sommer, G.**; Zierk, A.W.; Fedarovich, A.; Brock, A.; Fedarovich, D. und Heise, T.: *The RNA chaperon activity of the human La protein (LARP3)*. RNA & DISEASE (2015), 2, Seite e872, DOI 10.14800/rd.872.
- [62] **Hendrik, J.**; Wolin, S.; Rinke, J.; Lerner, M. und Steitz, J.A.: *Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells*. Molecular and Cellular Biology (1981), Vol. 1, No. 12, Seite 1138–1149.
- [63] **Mathews, M.B.** und Francoeur A.M.: *La autoantigen recognizes and binds to 3'-oligouridynlated tails of small RNA*. Molecular and Cellular Biology (1984), 6 (4), Seite 1134–1140, DOI 10.1128/MCB.4.6.1134.
- [64] **Francoeur, A.M.** und Mathews M.B.: *Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: formation of a ribonucleoprotein particle in vitro*. PNAS (1982), 79, Seite 6772–6776.
- [65] **Stefano, J.**: *Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylated stretch common to the 3' termi of RNA polymerase III transcripts*. Cell (1984), 1 (36), Seite 145–154, DOI 10.1016/0092-8674(84)90083-7.
- [66] **Gottlieb, E.** und Steitz J.A.: *Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III*. EMBO Journal (1989), 8, Seite 851–861.
- [67] **Maraia, R.J.** und Bayfield, M. A.: *The La Protein-RNA Complex Surfaces*. Molecular Cell (2006), 2 (21), Seite 149–152, DOI 10.1016/j.molcel.2006.01.004.
-

-
- [68] **Bogenhagen, D.** und Brown D.D.: *Nucleotide sequence in Xenopus 5S DNA required for transcription termination.* Cell (1981), 1 (24), Seite 261–270, DOI 10.1016/0092-8674(81)90522-5.
 - [69] **Rinke, J.** und Steitz J.A.: *Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies.* Cell (1982), 1 (29), Seite 149–159, DOI 10.1016/0092-8674(82)90099-X.
 - [70] **Itoh, Y.** und Reichlin, M.: *Autoantibodies to the Ro/SSA antigen are conformation dependent: I: anti-60 kD antibodies are mainly directed to the native protein; anti-52 antibodies are mainly directed to the denatured protein.* Autoimmunity (1992), 14, Seite 57–65, DOI 10.3109/08916939309077357.
 - [71] **Simons, F.;** Rutjies, S. und van Venrooij, W.J.: *The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA.* RNA (1996), 2, Seite 264–273.
 - [72] **Lerner, M.;** Andrews, N.; Miller, G. und Steitz, J.A.: *Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus.* PNAS (1981), 78, Seite 805–809.
 - [73] **Lerner, M.;** Boyle, J.; Hardin, J. und Steitz, J.A.: *Two novel class of small ribonucleoproteins detected by autoantibodies associated with lupus erythematosus.* Science (1981), 211, Seite 400–402.
 - [74] **Liang, C.;** Xiong, K.; Szulwach, K.E.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Peng, J.; Fu, M.; Jin, P.; Suzuki, H.I. und Liu, Q.: *Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition.* The Journal of Biological Chemistry (2013), 1 (288), Seite 723–736, DOI 10.1074/jbc.M112.401323.
 - [75] **Intine, R.;** Dundr, M.; Vassilev, A.; Schwartz, E.; Zhao, Y.; DePamphilis, M. und Maraia, R.J.: *Nonphosphorylated human La antigen interacts with nucleolin at nuclear sites involved in rRNA biogenesis.* Molecular and Cellular Biology (2004), 24 (24), Seite 10894–10904, DOI 10.1128/MCB.24.24.10894-10904.2004.
 - [76] **Hernández, G.:** *Was the initiation of translation in early eukaryotes IRES-driven?* Trends in Biochemical Sciences (2008), 2 (33), Seite 58–64, DOI 10.1016/j.tibs.2007.11.002.
 - [77] **Trotta, R.;** Vignudelli, T.; Candini, O.; Intine, R.; Pecorari, L.; Guerzoni, C.; Santilli, G.; Byrom, M.; Goldoni, S.; Ford, L.; Caligiuri, M.; Maraia, R.; Perrotti, D. und Calabretta, B.: *BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen.* Cancer Cell (2003), 3, Seite 145–160.
 - [78] **Holcik, M.:** *Translational upregulation of the X-linked inhibitor of apoptosis.* Annals New York Academic Sciences (2003), 1010, Seite 249–258.
 - [79] **Kim, Y.;** Back, S.; Rho, J.; Lee, S. und Jang, S.K.: *La autoantigen enhances translation of BiP mRNA.* Nucleic Acid Research (2001), 24 (29), Seite 5009–5016.
 - [80] **Holcik, M.** und Korneluk, R. G.: *Functional characterization of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: Role of La autoantigen in XIAP translation.* Molecular and Cellular Biology (2000), 20, Seite 4648–4657.
 - [81] **Carter, S.** und Sarnow, P.: *District mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites.* Journal of Biological Chemistry (2000), 36 (275), Seite 28301–28307.
 - [82] **Meerovitch, K.;** Svitkin, Y.; Lee, H.; Leibkowitz, F.; Kenan, D.; Chan, E.; Agol, V.; Keene, J. und Sonenberg, N.: *La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of polio virus RNA in reticulocyte lysate.* Journal of Virology (1993), 67, Seite 3798–3807.
 - [83] **Ray, P.S.** und Das, S.: *La autoantigen is required for the internal ribosome entry site-mediated translation of coxsackievirus B3 RNA.* Nucleic Acid Research (2002), 20 (30), Seite 4500–4508.
 - [84] **Costa-Mattioli, M.;** Svitkin, Y. und Sonenberg, N.: *La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro.* Molecular and Cellular Biology (2004), 15 (24), Seite 6861–6870, DOI 10.1128/MCB.24.15.6861-6870.2004.
-

-
- [85] **Waysbort, A.**; Bonnal, S.; Audigier, S.; Estève, J.-P. und Prast, A.-C.: *Pyrimidine tract binding protein and La autoantigen interact differently with 5'untranslated regions of lentiviruses and oncoretrovirus mRNAs*. FEBS Letters (2001), 490, Seite 54–58.
 - [86] **Ali, N.** und Siddiqui, A.: *The La antigen binds 5'noncoding regions of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site mediated translation*. PNAS (1997), 94, Seite 2249–2254.
 - [87] **Birko, V.**; Musiyenko, A.; Bayfield, M.; Maraia, R. und Barik, S.: *Cellular La protein shields nonsegmented negative-strand RNA viral leader RNA from RIG-I and enhances virus growth by diverse mechanisms*. Journal of Virology (2008), 16 (82), Seite 7977–7987.
 - [88] **Spangberg, K.**; Wiklund, L. und Schwartz, S.: *Binding of the La autoantigen to hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro*. Journal of General Virology (2001), Pt 1 (82), Seite 113–120.
 - [89] **Castro, A.**; Faura, M.; Agell, N.; Renau-Piqueras, J. und Bachs, O.: *The autoantigen La/SSB is a calmodulin-binding protein*. Cell Calcium (1996), 6 (20), Seite 493–500.
 - [90] **Bachmann, M.**; Pfeifer, K.; Schröder H.-C. und Müller W.E.G.: *Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties*. Cell (1990), 60, Seite 85–93.
 - [91] **Xiao, Q.**; Sharp, T.; Jeffrey, I.; James, M.; Pruijn, G.; van Venrooij, W. und Clemens, M.J.: *The La antigen inhibits the activation of the interferoninducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA*. Nucleic Acids Research (1994), 22, Seite 2512–2518.
 - [92] **Hühn, P.**; Pruijn, G.J.M.; van Venrooij, W.J. und Bachmann, M.: *Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme*. Nucleic Acids Research (1997), 25, Seite 410–416.
 - [93] **James, M.**; Jeffrey, I.; Pruijn, G.; Thijssen, J. und Clemens, M.J.: *Translation control by La antigen: structure requirements for rescue of double-stranded RNA-mediates inhibition of protein synthesis*. European Journal of Biochemistry (1999), 1 (266), Seite 151–162, DOI 10.1046/j.1432-1327.1999.00839.x.
 - [94] **Fok, V.**; Friend, K. und Steitz, J.A.: *Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling*. Cell Biology (2006), 3 (173), Seite 319–325.
 - [95] **Furukawa, F.**; Kashihara-Sawami, M.; Lyons, M. und Norris D.A.: *Binding of antibodies to the extractable nuclear antigen SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus*. Journal of Investigative Dermatology (1990), 1 (94), Seite 77–85, DOI 10.1111/1523-1747.ep12873930.
 - [96] **Bachmann, M.**; Chan, S.; Slor, H.; Kukulies, J. und Müller W.E.G.: *Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after uv irradiation of human keratinocytes*. Experimental Cell Research (1990), 60, Seite 171–180.
 - [97] **Bachmann, M.**; Althoff, H.; Tröster, H.; Selenka, C.; Falke, D. und Müller W.E.G.: *Translocation of the nuclear autoantigen La to cell surface of herpes simplex virus type I infected cells*. Autoimmunity (1992), 9, Seite 37–45, DOI 10.3109/08916939209146128.
 - [98] **Baboonian, A.**; Vebabkes, P.; Booth, J.; Williams, D.; Roffe, L. und Maini, R.N.: *Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SS-B): a possible mechanism for autoimmunity*. Clinical and Experimental Immunology (1989), 78, Seite 454–459.
 - [99] **Dörner, T.**; Hucko, M.; Mayet, W.; Trefzer, U.; Brumester, G. und Hiepe, F.: *Enhanced membrane expression of the 52 kDa Ro (SS-A) and La (SS-B) antigens by human keratinocytes induced by TNF alpha*. Annals of the Rheumatic Diseases (1995), 11 (54), Seite 904–909, DOI 10.1136/ard.54.11.904.
 - [100] **Rutjies, S.**; Utz, P.; van der Heijden, A.; Broekhuis, C.; van Venrooij, W. und Pruijn, G.J.M.: *The La(SS-B) autoantigen, a key protein in RNA biogenesis, is dephosphorylated and cleaved early during apoptosis*. Cell Death and Differentiation (1999), 6, Seite 976–986.
-

-
- [101] **Ayukawa, K.**; Taniguchi, S.; Masumoto, J.; Hashimoto, S.; Sarvotham, H.; Hara, A.; Aoyama, T. und Sagara, J.: *La autoantigen is cleaved in the COOH terminus and loses the nuclear localization signal during apoptosis*. Journal of Biological Chemistry (2000), 44 (275), Seite 34465–34470.
- [102] **Casciola-Rosen, L.**; Andrade, F.; Ulanet, D.; Wong, W. und Rosen, A.: *Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implication for initiation of autoimmunity*. Journal of Experimental Medicine (1999), 6 (190), Seite 815–825.
- [103] **Romero, V.**; Fellows, E.; Jenne, D. und Andrade, F.: *Cleavage of La protein by granzym H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translation activity*. Cell Death and Differentiation (2009), 16, Seite 340–348, DOI 10.1038/cdd.2008.165.
- [104] **Shiroki, K.**; Isoyama, T.; Kuge, S.; Ishii, T.; Ohmi, S.; Hata, S.; Suzuki, K.; Takasaki, Y. und Nomoto, A.: *Intracellular redistribution of truncated La protein produced by poliovirus 3Cpro-mediated cleavage*. Journal of Virology (1999), 3 (73), Seite 2193–2200.
- [105] **Bachmann, M.**; Chan, S.; Bernd, A.; Mayet, W.; Zum Mayer Büschenfelde, K.-H. und Müller W.E.G.: *Translocation of the nuclear antigen La to cell surface: assembly and disassembly with the extracellular matrix*. Journal of Autoimmunity (1991), 9, Seite 99–107.
- [106] **Golan, T.**; Elkon, K.; Gharavi, A. und Krueger, J.G.: *Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultures keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation*. Journal of Clinical Investigation (1992), 3 (90), Seite 1067–1076, DOI 10.1172/JCI115922.
- [107] **Bachmann, M.**; Mayet, W.; Schröder, H.; Pfeifer, K.; Zum Meyer Büschenfelde, K.-H. und Müller W.E.G.: *Association of La and Ro antigens with intracellular structures in HEp-2 carcinoma cells*. PNAS (1986), 83, Seite 7770–7774.
- [108] **Tröster, H.**; Bartsch, H.; Klein, R.; Metzger, E.; Pollak, G.; Semsei, I.; Schwemmle, M.; Puijn, G.; van Venrooij, W. und Bachmann, M.: *Activation of a murine autoreactive B cell by immunization with human recombinant autoantigen La/SS-B: characterization of the autoepitope*. Journal of Autoimmunity (1995), 8, Seite 825–842.
- [109] **Franke, C.**: *Das Protein La/SS-B: Vom Autoantigen zur Zielstruktur für die Immuntherapie*. (2009). Dissertation (AG Bachmann, M.; Technische Universität Dresden, Institut für Immunologie).
- [110] **Koristka, S.**; Cartellieri, M.; Arndt, C.; Bippes C.C.; Feldmann, A.; **Michalk, I.**; Wiefel, K.; Stamova, S.; Schmitz, M.; Ehninger, G.; Bornhäuser, M. und Bachmann, M.: *Retargeting of regulatory T cells to surface-inducible autoantigen La/SS-B*. Journal of Autoimmunity (2013), 42, Seite 105–116, DOI 10.1016/j.jaut.2013.01.002.
- [111] **Smith, P.**; Williams, D.; Venables, P. und Maini, R.N.: *Monoclonal antibodies to the sjögren's Syndrome associated antigen SS-B (La)*. Journal of Immunological Methodes (1985), 77, Seite 63–76.
- [112] **Tran, H.**; Ohlsson, M.; Beroukas, D.; Hiscock, J.; Bardley, J.; Buyon, J. und Gordon, T.P.: *Anti-La/SSB antibodies transported across the placenta bind apoptotic cells in fetal organs targeted in neonatal lupus*. Arthritis and Rheumatism (2002), 1 (46), Seite 202–208, DOI 10.1002/art.10062.
- [113] **Arndt, C.**; Bonin, M. von; Cartellieri, M.; Feldmann, A.; Koristka, S.; **Michalk, I.**; Stamova, S.; Bornhäuser, M.; Schmitz, M.; Ehninger, G. und Bachmann, M.: *Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33–CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells*. Leukemia (2013), 27, Seite 964–967, DOI 10.1038/leu.2013.18.
- [114] **Arndt, C.**; Feldmann, A.; Bonin, M. von; Ewen, E.-M.; Koristka, S.; **Michalk, I.**; Stamova, S.; Berndt, N.; Gocht, A.; Bornhäuser, M.; Ehninger, G.; Schmitz, M. und Bachmann, M.: *Costimulation improves the killing capability of T cells redirected to tumor cells expressing low levels of CD33: description of a novel modular targeting system*. Leukemia (2014), 28, Seite 59–69, DOI 10.1038/leu.2013.243.
-

-
- [115] **Arndt, C.;** Feldmann, A.; Töpfer, K.; Koristka, S.; Cartellieri, M.; Temme, A.; Ehniger, A.; Ehniger, G. und Bachmann, M.: *Redirection of CD4+ and CD8+ T lymphocytes via a novel antibody-based modular targeting system triggers efficient killing of PSCA+ prostate tumor cells*. The Prostate (2014), (im Druck), DOI 10.1002/pros.22851.
- [116] **Arndt, C.;** Feldmann, A.; Koristka, S.; Cartellieri, M.; Dimmel, M.; Ehniger, A.; Ehniger, G. und Bachmann, M.: *Simultaneous targeting of prostate stem cell antigen and prostate-specific membrane antigen improves the killing of prostate cancer cell using a novel modular T cell-retargeting system*. The Prostate (2014), (im Druck), DOI 10.1002/pros.22850.
- [117] **Feldmann, A.;** Arndt, C.; Töpfer, K.; Stamova, S.; Krone, F.; Cartellieri, M.; Koristka, S.; Michalk, I.; Lindemann, D.; Schmitz, M.; Temme, A.; Bornhäuser, M.; Ehniger, G. und Bachmann, M.: *Novel humanized and highly efficient bispecific antibodies mediated killing of prostate stem cell antigen-expressing tumor cells by CD8⁺ and CD4⁺ T cells*. Journal of Immunology (2012), 6 (189), Seite 3249–3259, DOI 10.4049/jimmunol.1200341.
- [118] **Nitta, T.;** Tam, R.; Kim, J. und Fan, H.: *The Cellular Protein La Functions in Enhancement of Virus Release The cellular protein La functions in enhancement of virus release through lipid rafts facilitated by murine leukemia virus glycosylated gag*. mbio (2011), 1 (2), Seite e00341-10.
- [119] **Langley, A.R.;** Chambers, H.; Christov, C.P. und Krude, T.: *Ribonucleoprotein particles containing non-coding Y RNAs, Ro60, La and nucleolin are not required for Y RNA function in DNA replication*. PLoS ONE (2010), DOI 10.3171/journal.pone.0013673.
- [120] **Perez-Leal, O.;** Barrero, C.; Clarkson, A.; Casero, R. und Merali, S.: *Polyamine-regulated translation of spermidine/spermine-N1-acetyl-transferase*. Molecular and Cellular Biology (2012), 32, Seite 1453–1467.
- [121] **Berg, J.M.;** Tymoczko, J.L. und Stryer, L.: *Biochemie* (2003), Auflage 5, Spektrum Akademischer Verlag GmbH (Heidelberg Berlin), Kapitel: 51; 71 ff.
- [122] **Wehner, R.:** *Interaktion von dendritischen Zellen und Effektorzellen der frühen antitumoralen Immunabwehr*. (2008). Dissertation (AG Schmitz, M.; Technische Universität Dresden, Institut für Immunologie).
- [123] **Wehner, R.;** Löbel, B.; Bornhäuser, M.; Schäkel, K.; Cartellieri, M.; Bachmann, M.; Rieber, E.P. und Schmitz, M.: *Reciprocal activating interaction between 6-sulfo LacNAc+ dendritic cells and NK cells*. International Journal of Cancer (2009), 124, Seite 358–366.
- [124] **Hauptmann, N.;** Pion, M.; Wehner, R.; Munoz-Fernández, M.-Á.; Schmitz, M.; Voit, B. und Appelhans, D.: *Potential of Ni(II)-NTA-modified poly(ethylen imine) glycopolymers as carrier systems for future dendritic cell-based immunotherapy*. Biomacromolecules (2014), 15, Seite 957–967.
- [125] **Duerrschmidt, N.;** Stielow, C.; Müller, G.; Pagano, P.J. und Morawitz, H.: *NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells*. The Journal of Physiology (2006), 576, Seite 557–567, DOI 10.1113/jphysiol.2006.111070.
- [126] **Jaffe, E.A.;** Nachman, R.L.; Becker, C.G. und Minick C.R.: *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. Journal of Clinical Investigation (1973), 52, Seite 2745–2756.
- [127] **Laemmli, U.K.:** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature (1970), 227, Seite 680–685.
- [128] **Johnson, W.:** *Extending circular dichroism spectra into the vacuum UV and its applications to proteins*. Photochemistry and Photobiology (1986), 44 (3), Seite 307–313, DOI 10.1111/j.1751-1097.1986.tb04669.x.
- [129] **Johnson, W.:** *Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide*. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics (1990), 7 (3), Seite 205–214, DOI 10.1002/prot.340070302.
- [130] **Johnson, W.C.:** *Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures*. PROTEINS: Structure, Function and Genetics (1999), 35, Seite 307–312, DOI 10.1002/(SICI)1097-0134(19990515)35:3<307::ADI-PROT4>3.0.CO;2-3.
-

-
- [131] **Sreerama, N.;** Venyaminov, S.Y. und Woody, R. W.: *Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy*. Protein Science (1999), 8, Seite 370–380, DOI 10.1110/ps.8.2.370.
 - [132] **Greenfield, N.J.:** *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nature Protocols (2007), 1, Seite 2876–2890, DOI 10.1038/nprot.2006.202.
 - [133] **Greenfield, N.J.:** *Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions*. Nature Protocols (2006), 1, Seite 2527–2535, DOI 10.1038/nprot.2006.204.
 - [134] **Hänsel, A.;** Günther, C.; Baran, W.; Bidier, M.; Lorenz, H.-M.; Schmitz, M.; Bachmann, M.; Döbel, T.; Enk, A. und Schäkel, K.: *Human 6-sulfo LacNAc (sIa) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus*. Journal of Autoimmunity (2013) (40), Seite 1–8, DOI 10.1016/j.jaut.2012.07.005.
 - [135] **Jähnisch, H.;** Wehner, R.; Tunger, A.; Kunze, A.; Oehrl, S.; Schäkel, K.; Rohayem, J.; Bornhäuser, M.; Tonn, T.; Bachmann, M. und Schmitz, M.: *TLR7/8 agonists trigger immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc dendritic cells*. Cancer Letters (2013), 1 (335), Seite 119–127, DOI 10.1016/j.canlet.2013.02.003.
 - [136] **Akizuki, M.;** Powers, R. und Holman, H. R.: *A soluble acidic protein of cell nucleus which react with serum of patients with systemic lupus erythematosus and sjögren's syndrome*. Journal of Clinical Investigation (1977), 59, Seite 264–272.
 - [137] **Habets, W.;** den Brok, J.; Boerbooms, A.; van de Putte, L. und van Venrooij, W.J.: *Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells*. EMBO Journal (1983), 2, Seite 1625–1631.
 - [138] **Venables, P.;** Smith, P. und Maini, R.N.: *Purification and characterization of sjögren's syndrome A and B antigens*. Clinical and Experimental Immunology (1983), 54, Seite 731–738.
 - [139] **Chambers, J.;** Kenan, D.; Martin, B. und Keene, J.D.: *Genomic structure and amino acid sequence domains of human La autoantigen*. Journal of Biological Chemistry (1988), 263 (34), Seite 1843–1861.
 - [140] **Chan, E.;** Sullivan, K. und Tan, E.M.: *Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding*. Nucleic Acids Research (1989), 17, Seite 2233–2244.
 - [141] **Morgan, M.J. und Liu, Z.-G.:** *Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling*. Cell Research (2011), 21, Seite 103–115, DOI 10.1038/cr.2010.178.
 - [142] **Odin, J.A.;** Huebert, R.C.; Casciola-Rosen, L.; LaRusso, N.F. und Rosen, A.: *Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis*. Journal of Clinical Investigation (2001), 108 (2), Seite 223–232, DOI 10.1172/JCI200110716.
 - [143] **Tsukumo, S. und Yasutomo, K.:** *DNase I in pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Clinical Immunology (2004), 113, Seite 14–18, DOI 10.1016/j.clim.2004.05.009.
 - [144] **Martinez-Valle, F.;** Balada, E.; Ordi-Ros, J.; Bujan-Rivas, S.; Sellas-Fernandez, A. und Vilardell-Tarres, M.: *DNase I activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features*. Lupus (2009), 18, Seite 418–423.
 - [145] **Bayfield, M.;** Yang, R. und Maraia, R.J.: *Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs)*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms (2010), 5-6 (1799), Seite 365–378, DOI 10.1016/j.bbaggm.2010.01.011.
 - [146] **Wang, G.;** Pierangeli, S.S.; Papalardo, E.; Ansari, G. und Khan, M. F.: *Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism (2010), 7 (62), Seite 2064–2072, DOI 10.1002/art.27442.
-

-
- [147] **Grune, T.**; Reinheckel, T. und Davies, K. J.: *Degradation of oxidized proteins in mammalian cells*. The FASEB Journal (1997), 11 (7), Seite 526–534, DOI 10.1096/fj.1530-6860.
 - [148] **Nuttall, S.L.**; Heaton, S.; Piper, M.K.; Martin, U. und Gordon, C.: *Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus - evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia*. Rheumatology (2003), 42 (6), Seite 758–762, DOI 10.1093/rheumatology/keg212.
 - [149] **Matsuura, E.**: *Autoimmune-mediated arterothrombosis*. Lupus (2008), 17 (10), Seite 879–888, DOI 10.1177/0961203308093553.
 - [150] **Clark, G.**; Lamey, P.; Jarrett, R. und Onions, D.E.: *A model to study viral and cytokine involvement in sjögren's syndrome*. Autoimmunity (1994), 18, Seite 7–14.
 - [151] **Marcos, M.**; Alvarez, F.; Brito-Zerón, P.; Bove, A.; Perez-De-Lis, M.; Diaz-Lagares, C.; Sanchez-Tapias, J. und Ramos-Casals, M.: *Chronic hepatitis B virus infection in sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in 603 patients*. Autoimmunity Reviews (2009), 7 (8), Seite 616–620, DOI 10.1016/j.autrev.2009.02.007.
 - [152] **Shah, D.**; Wanchu, A. und Bhatnagar, A.: *Interaction between oxidative stress and chemokines: Possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Immunobiology (2011), 9 (216), Seite 1010–1017, DOI 10.1016/j.imbio.2011.04.001.
 - [153] **Hua, J.**; Kirou, K.; Lee, C. und Crow, M.K.: *Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies*. Arthritis & Rheumatism (2006), 6 (54), Seite 1906–1916, DOI 10.1002/art.21890.
 - [154] **Li, Q.-Z.**; Zhou, J.; Lian, Y.; Zhang, B.; Branch, V.K.; Carr-Johnson, F.; Karp, D.R.; Mohan, C.; Wakeland, E.K. und Olsen, N. J.: *Interferon signature gene expression is correlated with autoantibody profiles in patients with incomplete lupus syndromes*. Clinical & Experimental Immunology (2010), 3 (153), Seite 281–291, DOI 10.1111/j.1365-2249.2009.04057.x.
 - [155] **Kang, R.**; Livesy, K.M.; Zeh III, H.J.; Lotze, M.T. und Tang, D.: *HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress*. Autophagy (2011), 7 (8), Seite 904–906, DOI 10.1089/ars.2010.3666.
 - [156] **Deubzer, B.**: *Der Einfluss von Ascorbat, 2-Desoxy-D-Glukose und Dichlorazetat auf das Wachstum und den Glukosestoffwechsel von Neuroblastomzellen mit und ohne N-myc-Amplifikation*. (2010). Dissertation (Eberhard-Karls-Universität Tübingen; Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin; Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie).
 - [157] **Perle, M.**: *Auslösung von Zelltod durch Peroxid-induzierten oxidativen Stress in kultivierten C6-Astrogliazellen*. (2010). Dissertation (Christian-Alberts-Universität Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät).
 - [158] **Campo, G.M.**; D'Ascola, A.; Avenoso, A.; Campo, S.; Ferlazzo, A.M.; Micali, C.; Zanghì, L. und Calatroni, A.: *Glycosaminoglycans reduced oxidative damage induced by copper (Cu²⁺), iron (Fe²⁺) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in human fibroblast cultures*. Glycoconjugate Journal (2003), 2 (20), Seite 133–141.
 - [159] **Presti, D.** und Scott, J. E.: *Hyaluronan-mediated protection effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH[•]) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass*. Cell Biochemistry and Function (1994), 4 (12), Seite 281–288, DOI 10.1002/cbf.290120409.
 - [160] **Sing, V.**; Mehrotra, A.; Narayan, P.; Pandey, C. und Agarwal, S.S.: *Modulation of autoimmune disease by nitric oxide*. Immunologic Research (2000), 1 (22), Seite 1–19.
 - [161] **Brüne, B.**; Knethen, A. und Sandau, K.B von: *Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis*. Cell Death and Differentiation (1999).
 - [162] **Belmont, H.**; Levartovsky, D.; Goel, A.; Amin, A.; Giorno, R.; Rediske, J.; Skovron, M. und Abramson, S.B.: *Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of*
-

- inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism (1997), 19 (40), Seite 1810–1816.
- [163] **Wanchu, A.**; Khullar, M.; Deodhar, S.; Bamberg, P. und Sud, A.: *Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology International (1996), 2 (18), Seite 41–43.
- [164] **Weinberg, J.B.**; Granger, D.L.; Pisetsky, D.S.; Sedlin, M.F.; Misukonis, M.A.; Mason, S.N.; Pippen, A.M.; Ruiz, P.; Wood, E.R. und Gilkeson, G. S.: *The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune diseases: increased nitric oxide production and nitric oxide synthetase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administrated NG-monomethyl-L-arginine*. Journal of Experimental Medicine (1994), 179, Seite 651.
- [165] **Xia, Y.** und Zweier, J. L.: *Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages*. PNAS (1997), 94, Seite 6954–6958.
- [166] **Karpuzoglu, E.** und Ahmed, S. A.: *Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells. Implication for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis*. Nitric Oxide (2006), 15, Seite 177–186, DOI 10.1016/j.niox.2006.03.009.
- [167] **Schörner, C.**: *Untersuchung des murinen, nukleären pSS- und SLE-Autoantigens La/SS-B unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen*. (2000). Dissertation (AG Bachmann, M.; Johannes Gutenberg-Universität, Mainz).
- [168] **Perricone, C.**; Carolis, C. de und Perricone, R.: *Glutathione: a key player in autoimmunity*. Autoimmunity Reviews (2009), 8 (8), Seite 697–701, DOI 10.1016/j.autrev.2009.02.020.
- [169] **Courtney, P.**; Crockard, A.; Williamson, K.; Irvine, A.K.R. und Bell, A.L.: *Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relation with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia*. Ann Rheum Dis (1999), 58, Seite 309–314.
- [170] **Jin, O.**; Sun, L.; Zhou, K.; Zhang, X.; Feng, X.; Mok, M. und Lau, C.: *Lymphocyte apoptosis and macrophage function: correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus*. Clinical Rheumatology (2005), 24, Seite 107–110, DOI 10.1007/s10067-004-0972-x.
- [171] **Lozovoy, M.**; Simao, A.; Hohmann, M.; Simao, T.; Barbosa, D.; Morimoto, H.; Reiche, E.; Cecchini, R. und Dichi, I.: *Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome*. Lupus (2011), 13 (20), Seite 1356–1364, DOI 10.1177/0961203311411348.
- [172] **Shah, D.**; Sah, S.; Wanchu, A.; Wu, M. und Bhatnagar, A.: *Altered redox state and apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Immunobiology (2013), 4 (218), Seite 620–627, DOI 10.1016/j.imbio.2012.07.030.
- [173] **Shah, D.**; Sah, S. und Nath, S.K.: *Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity Reviews (2013), 7 (12), Seite 741–751, DOI 10.1016/j.autrev.2012.12.007.
- [174] **Liebsch, M.**: *Die Geschichte der Validierung des LAL-Tests*. ALTEX (1995), 12 (2), Seite 76–80.
- [175] **Casciola-Rosen, L.**; Anhalt, G. und Rosen, A.: *Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two population of surface structures on apoptotic keratinocytes*. Journal of Experimental Medicine (1994), 179, Seite 1317–1330.
- [176] **Schiller, M.**; Bekeredjian-Ding, I.; Hyder, P.; Blank, N.; Ho, A.D. und Lorenz, H.-M.: *Autoantigenes are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis*. Cell Death and Differentiation (2008), 15, Seite 183–191, DOI 10.1038/sj.cdd.4402239.
- [177] **Wu, X.**; Molinaro, C.; Johnson, N. und Casiano, C.A.: *Secondary Necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens*. Arthritis and Rheumatism (2001), 11 (44), Seite 2642–2652.

-
- [178] **Aringer, M.**; Günther, C. und Lee-Kirsch, M.A.: *Innate immune processes in lupus erythematosus*. Clinical Immunology (2013), 3 (147), Seite 216–222, DOI 10.1016/j.clim.2012.11.012.
- [179] **Lozovoy, M.**; Simao, A.; Panis, C.; Rotter, M.; Reiche, E.; Morimoto, H.; Lavado, E.; Cecchini, R. und Dichi, I.: *Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus (2011), 12 (20), Seite 1250–1259, DOI 10.1177/0961203311411350.
- [180] **Bijl, M.**; Reefman, E.; Horst, G.; Limburg, P. und Kallenberg, C.G.M.: *Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement*. Annals of the Rheumatic Diseases (2006), 65, Seite 57–63, DOI 10.1136/ard.2005.035733.
- [181] **Gaipl, U.**; Kuhn, A.; Sheriff, A.; Munoz, L.; Franz, S.; Voll, R.; Kalden, J. und Herrmann M.: *Clearance of apoptotic cells in Human SLE*. Curr Dir Autoimmun. Basel, Karger (2006), 9, Seite 173–187.
- [182] **Tas, S.**; Quartier, P.; Botto, M. und Fossati-Jimack, L.: *Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells*. Annals of the Rheumatic Diseases (2006), 65, Seite 216–221, DOI 10.1136/ard.2005.037143.
- [183] **Silva, M.**; do Vale, A. und dos Santos, N.M.N.: *Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications*. Apoptosis (2008), 13, Seite 463–482, DOI 10.1007/s10495-008-0187-8.
- [184] **Crow, Y.J.** und Rehwinkel, J.: *Aicardi-Gourières syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity*. Human Molecular Genetics (2009), 18 (2), Seite R130–R136.
- [185] **Monneaux, F.**; Briand, J.-P. und Muller, S.: *B and T cell immune response to small nuclear ribonucleoprotein particles in lupus mice: autoreactive CD4+ T cells recognize a T cell epitope located within the RNP80 motif of the 70K protein*. European Journal of Immunology (2000), 30 (8), Seite 2191–2200, DOI 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2191::AID-IMMU2191>3.0.CO;2-R.
- [186] **Takeno, M.**; Nagafuchi, H.; Kaneko, S.; Wakisaka, S.; Oneda, K.; Takaba, Y.; Yamashita, N.; Suzuki, N.; Kaneoka, H. und Sakane, T.: *Autoreactive T cell clones from patients with systemic lupus erythematosus support polyclonal antibody production*. Journal of Immunology (1997), 158 (7), Seite 3529–3538.
- [187] **Yurasov, S.**; Wardemann, H.; Hammersen, J.; Tsuiji, M.; Meffre, E.; Pascual, V. und Nussenzweig, M. C.: *Defective B cell tolerance checkpoint in systemic lupus erythematosus*. Journal of Experimental Medicine (2005), 201 (5), Seite 703–711.
- [188] **Narshi, C.**; Giles, I. und Rahman, A.: *The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus?* Lupus (2011), 1 (20), Seite 5–13, DOI 10.1177/0961203310382429.
-

7. Anhang

7.1 Homologe Proteine zum humanen La Protein

Die folgende Tabelle zeigt die Resultate der Suche nach Homologen in der NCBI-Datenbank zur La wt Aminosäuresequenz, wie sie in Abbildung 9 dargestellt ist. [NCBI-Datenbank: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Analysedatum: 04.05.2014].

Tabelle 32: Resultate der Homologiesuche zur La wt Aminosäuresequenz in der NCBI-Datenbank

Basisinformationen der Homologiesuche vom 04.05.2014						
RID:	Y0B01R (Expires on 05-04 17:22 pm)					
Query ID:	Ic 91325					
Description:	None					
Molecule type:	Amino Acid					
Query Length:	408					
Database Name:	nr All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects					
Description:						
Program:	BLASTP 2.2.29+					

Spezies	Proteinsequenz Accession	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Identity
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_006766607.1	768	768	100%	0.0	94%
	EFB23767.1	698	698	90%	0.0	94%
<i>Alligator mississippiensis</i>	XP_006025682.1	602	602	100%	0.0	76%
<i>Alligator sinensis</i>	ERE72020.1	600	600	81%	0.0	87%
	XP_006025683.1	601	601	100%	0.0	76%
	XP_006025684.1	601	601	100%	0.0	76%
<i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i>	XP_007183316.1	776	776	100%	0.0	95%
	XP_007183317.1	659	659	88%	0.0	92%
<i>Bos taurus</i>	XP_005202366.1	760	760	100%	0.0	94%
	NP_788838.1	759	759	100%	0.0	93%
<i>Bubalus bubalis</i>	XP_006060063.1	769	769	100%	0.0	94%
<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002749328.1	803	803	100%	0.0	97%
<i>Camelus ferus</i>	XP_006182907.1	779	779	100%	0.0	95%
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_535952.2	769	769	100%	0.0	94%
<i>Capra hircus</i>	XP_005676041.1	766	766	100%	0.0	94%
	XP_005676042.1	648	648	88%	0.0	91%
<i>Cavia porcellus</i>	XP_003478693.1	780	780	100%	0.0	96%
<i>Ceratotherium simum simum</i>	XP_004428264.1	746	746	100%	0.0	94%
<i>Chelonia mydas</i>	XP_007056651.1	591	591	100%	0.0	79%
	EMP38684.1	579	579	97%	0.0	79%
<i>Chinchilla lanigera</i>	XP_005378578.1	777	777	100%	0.0	95%

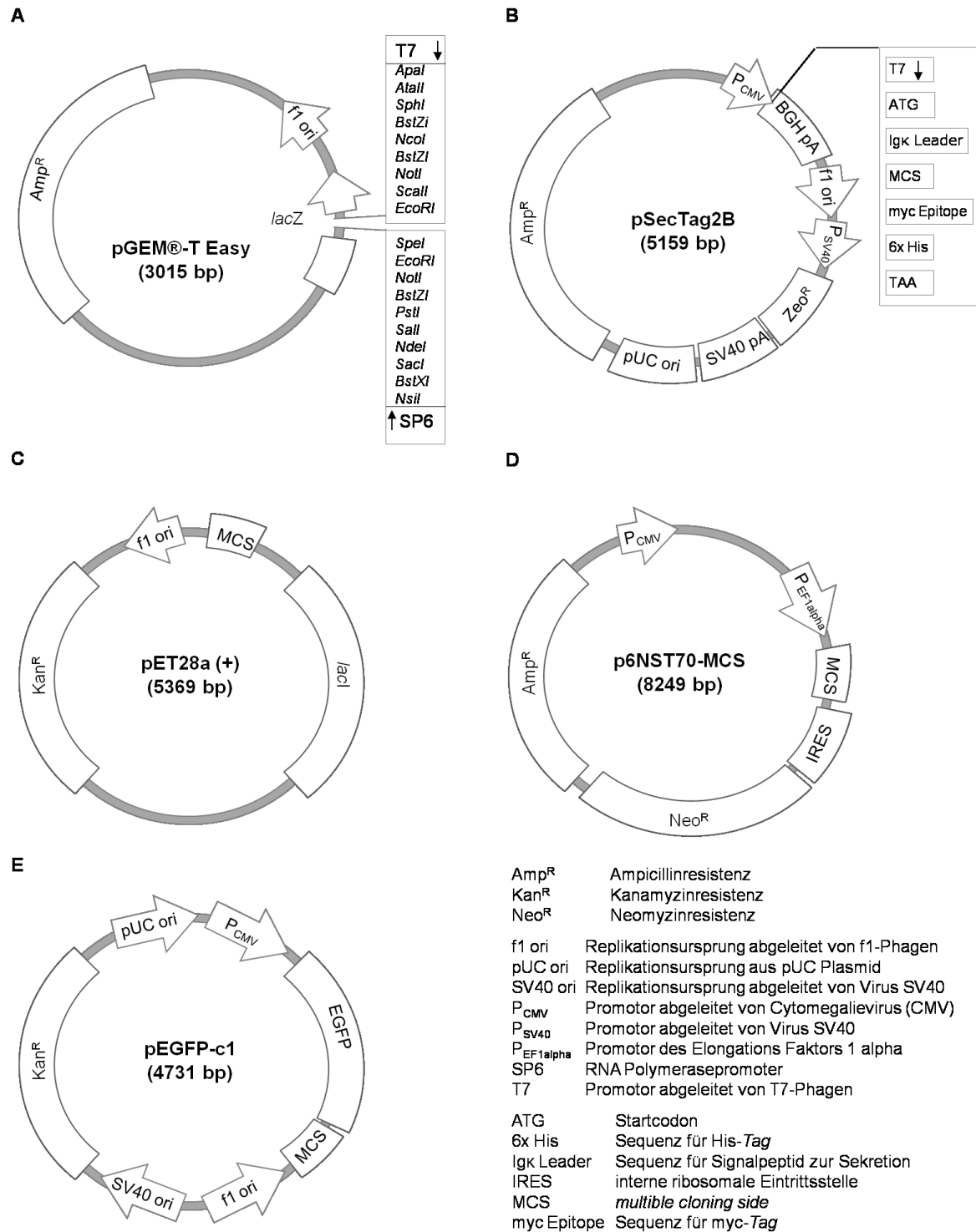
Anhang

<i>Chrysemys picta bellii</i>	EHB01231.1	591	591	77%	0.0	93%
<i>Chrysochloris asiatica</i>	XP_006867089.1	687	687	100%	0.0	89%
<i>Condylura cristata</i>	XP_004674617.1	759	759	100%	0.0	92%
<i>Cricetulus griseus</i>	ERE72022.1	599	599	81%	0.0	87%
	ERE72021.1	599	599	89%	0.0	83%
	EGV95649.1	626	626	100%	0.0	79%
	XP_003495991.1	654	654	100%	0.0	77%
	XP_006268924.1	601	601	100%	0.0	76%
<i>Dasytus novemcinctus</i>	XP_004460847.1	769	769	100%	0.0	94%
	XP_004460846.1	716	716	93%	0.0	94%
<i>Echinops telfairi</i>	XP_004703813.1	705	705	100%	0.0	89%
	XP_004706495.1	691	691	100%	0.0	88%
<i>Equus caballus</i>	XP_001497943.1	785	785	100%	0.0	96%
<i>Felis catus</i>	XP_003990890.1	771	771	100%	0.0	94%
<i>Gallus gallus</i>	NP_001180598.1	583	583	100%	0.0	75%
<i>Heterocephalus glaber</i>	XP_004908357.1	781	781	100%	0.0	95%
	XP_004839921.1	725	725	100%	0.0	89%
	EHB03361.1	673	673	100%	0.0	84%
	XP_005290483.1	593	593	100%	0.0	79%
<i>Homo sapiens</i>	AAA36577.1	708	708	86%	0.0	99%
	CAA32815.1	584	584	72%	0.0	98%
	EAX11256.1	676	676	87%	0.0	97%
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	XP_004791028.1	776	776	100%	0.0	95%
<i>Jaculus jaculus</i>	XP_004673279.1	684	684	100%	0.0	81%
<i>Leptonychotes weddellii</i>	XP_006734769.1	775	775	100%	0.0	95%
<i>Lipotes vexillifer</i>	ELK04684.1	774	774	100%	0.0	95%
<i>Loxodonta africana</i>	XP_003405846.1	695	695	100%	0.0	91%
<i>Macaca fascicularis</i>	NP_001270975.1	810	810	100%	0.0	99%
	EHH54933.1	801	801	100%	0.0	98%
	XP_005573490.1	691	691	88%	0.0	96%
<i>Macaca mulatta</i>	EHH21448.1	801	801	100%	0.0	98%
	XP_002808052.1	762	762	100%	0.0	94%
<i>Mesocricetus auratus</i>	XP_005065228.1	669	669	100%	0.0	78%
<i>Microtus ochrogaster</i>	XP_005346589.1	635	635	100%	0.0	79%
<i>Monodelphis domestica</i>	XP_001367741.1	608	608	100%	0.0	83%
<i>Mus musculus</i>	EDL27051.1	644	644	100%	0.0	77%
	XP_006499132.1	643	643	100%	0.0	77%
	NP_033304.1	643	643	100%	0.0	77%
	BAE40655.1	641	641	100%	0.0	77%
	BAC40498.1	640	640	100%	0.0	77%
<i>Mustela putorius furo</i>	XP_005324629.1	776	776	100%	0.0	95%
	XP_004744103.1	775	775	100%	0.0	95%
<i>Myotis brandtii</i>	XP_005857623.1	771	771	100%	0.0	94%
<i>Myotis davidii</i>	XP_002916547.1	768	768	100%	0.0	94%
	P38656.1	657	657	100%	0.0	77%
<i>Myotis lucifugus</i>	XP_006083216.1	766	766	100%	0.0	94%

Anhang

<i>Nomascus leucogenys</i>	XP_003254284.1	814	814	100%	0.0	99%
	XP_003254283.1	813	813	100%	0.0	99%
<i>Ochotona princeps</i>	XP_004577136.1	741	741	100%	0.0	94%
<i>Octodon degus</i>	XP_004649032.1	616	616	79%	0.0	95%
<i>Orcinus orca</i>	XP_004267329.1	769	769	100%	0.0	94%
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_001514775.1	634	634	100%	0.0	84%
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_002712319.1	759	759	100%	0.0	95%
<i>Otolemur garnettii</i>	XP_003800907.1	764	764	100%	0.0	93%
<i>Ovis aries</i>	XP_004004660.1	741	741	100%	0.0	93%
<i>Pan troglodytes</i>	NP_001267347.1	822	822	100%	0.0	99%
<i>Panthera tigris altaica</i>	XP_007074653.1	770	770	100%	0.0	94%
<i>Pantholops hodgsonii</i>	XP_005976982.1	765	765	100%	0.0	93%
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	XP_006972462.1	667	667	100%	0.0	81%
<i>Physeter catodon</i>	XP_007109909.1	776	776	100%	0.0	95%
	XP_007109910.1	659	659	88%	0.0	92%
<i>Pteropus alecto</i>	XP_006921238.1	770	770	100%	0.0	95%
	XP_007452691.1	772	772	100%	0.0	94%
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_006766608.1	656	656	88%	0.0	91%
	XP_006234385.1	666	666	100%	0.0	80%
	XP_006234384.1	666	666	100%	0.0	80%
	XP_006234383.1	662	662	100%	0.0	78%
	XP_001058361.1	650	650	100%	0.0	78%
	NP_112381.2	662	662	100%	0.0	77%
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	XP_003921941.1	808	808	100%	0.0	99%
<i>Sarcophilus harrisii</i>	XP_003763983.1	629	629	100%	0.0	83%
<i>Sorex araneus</i>	XP_004601199.1	762	762	100%	0.0	94%
<i>Sus scrofa</i>	XP_001925033.2	607	607	98%	0.0	77%
<i>Trichechus manatus latirostris</i>	XP_004375587.1	728	728	100%	0.0	93%
<i>Tupaia chinensis</i>	XP_006153613.1	714	714	98%	0.0	89%
	ELW67888.1	653	653	91%	0.0	87%
<i>Vicugna pacos</i>	XP_006214027.1	779	779	100%	0.0	95%

7.2 Vektorkarten der fünf Basisvektoren pGEM®-T Easy, pSecTag2B®, pET28a, p6NST70-MCS, pEGFP-c1



V. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des humanen La Gens inklusiver der La-mRNS-Isoformen (adaptiert nach Grölz et al. 1998 [28]).	8
Abbildung 2:	Schematische Struktur des La Proteins.	8
Abbildung 3:	Dreidimensionale Strukturen des La-Motivs, sowie von RRM1 und RRM2. Dargestellt sind die räumlichen Strukturen der drei La-Domänen.	9
Abbildung 4:	LaC mit Dimerisationsdomäne und Lokalisationssequenzen des La Proteins. LaC	11
Abbildung 5:	Schematische Darstellung von Y1-RNP (adaptiert nach Itoh <i>et al.</i> 1992 [69] und Simons <i>et al.</i> 1996 [70]).	13
Abbildung 6:	LaC mit weiteren potentiellen, funktionellen Elementen.	14
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Epitopbereiche der verschiedenen anti-La mAK.	16
Abbildung 8:	Verwendung von <i>anti</i> -La 5B9 als Komponente in scBsTaFvs zur Quervernetzung von T-Zellen und Targetzellen (adaptiert an [112] und [109]).	18
Abbildung 9:	Aminosäuresequenz des La Proteins.	21
Abbildung 10:	Räumliche Umgebung der Cysteine im La Protein.	22
Abbildung 11:	Klonierungsstrategie zur Generierung der Cysteinmutanten des La Proteins	75
Abbildung 12:	Schematische Übersicht der erzeugten und im Folgenden untersuchten rekombinanten La Proteine.	76
Abbildung 13:	Graustufendarstellungen eines Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-Gels zur Beurteilung der Reinheit und Konzentrationsabschätzung der rekombinanten La Proteine.	77
Abbildung 14:	<i>Westernblot</i> -Analysen der Reinigung rekombinanter La Protein.	79
Abbildung 15:	ELISA-Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung von SW5, 5B9, 7B6 und 312B.	81
Abbildung 16:	Generierung von LaN und LaN_C ₁₈ A.	82
Abbildung 17:	Produktion von LaN und LaN_C ₁₈ A.	83
Abbildung 18:	ELISA-Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung von 312B und 2F9 im Vergleich zu SW5 und 5B9.	84
Abbildung 19:	ELISA-Studien zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten (K _D -Werte) von SW5, 5B9, 7B6 und 312B gegenüber von oxidiertem La wt und der Cysteinmutante La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	85
Abbildung 20:	ELISA-Studien zur redoxabhängigen Antigenerkennung von Autoantikörpern aus Seren von SLE-Patienten.	87

Abbildung 21:	<i>Westernblot</i> -Analyse zur Untersuchung des Oligomerisationsverhaltens.	89
Abbildung 22:	<i>Westernblot</i> -Analyse zur Untersuchung des Oligomerisationsverhaltens in Kombination mit der redoxabhängigen Antigenerkennung durch die <i>anti</i> -La mAK 7B6 und 312B.	91
Abbildung 23:	Generierung von LaC und LaC_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	92
Abbildung 24:	Resultate der Produktion und Reinigung von LaC und LaC_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	93
Abbildung 25:	<i>Westernblot</i> -Analyse zur Untersuchung des Dimerisationsverhaltens.	94
Abbildung 26:	Generierung der Fusionsproteine, EGFP-La wt und EGFP-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	95
Abbildung 27:	Die Erzeugung von 3T3 Zelllinien mit stabiler Expression von EGFP-La wt und EGFP-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	96
Abbildung 28:	Fluoreszenzmikroskopische Studien zur intrazellulären La Proteinerkennung durch die anti-La mAK SW5, 5B9, 7B6 und 312B in 3T3 Zellen mit Überexpression von EGFP-La wt beziehungsweise EGFP-La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	98
Abbildung 29:	Fluoreszenzmikroskopische Studien zur redoxabhängigen intrazellulären Antigenerkennung von SW5, 7B6 und 312B.	101
Abbildung 30:	CD-Spektren der vier La Proteine in Ab- und Anwesenheit von Cu ²⁺ Ionen.	105
Abbildung 31:	Ermittlung der thermischen Denaturierung für La wt und La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A in Ab- und Anwesenheit von Cu(II)SO ₄ .	108
Abbildung 32:	Fluoreszenzmikroskopische Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in 3T3 EGFP-La wt Zellen nach rezeptorunabhängiger Induktion von oxidativen Stress.	111
Abbildung 33:	Die schematische Darstellung eines möglichen Signalweges zur Erklärung <i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR) abhängiger zytoplasmatischer La Anreicherung.	112
Abbildung 34:	Fluoreszenzmikroskopische Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in verschiedenen Zelltypen nach Induktion von oxidativem Stress durch H ₂ O ₂ , NO-Glutathion und Lipopolysaccharid (LPS).	114
Abbildung 35:	Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in verschiedenen Zelltypen nach Induktion von oxidativem Stress durch H ₂ O ₂ , NO-Glutathion und Lipopolysaccharid (LPS).	115
Abbildung 36:	Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Studien zur zytoplasmatischen La Anreicherung in verschiedenen Zelltypen nach Induktion von oxidativem Stress durch Resiquimod [®] .	116
Abbildung 37:	Fluoreszenzmikroskopische Studien und deren Quantifizierung zur zytoplasmatischen La Anreicherung in HUVECs nach Induktion von oxidativem Stress durch verschiedene Stimuli.	118

Abbildung 38:	Bindung von rekombinantem La wt beziehungsweise La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A auf murinen A9 Zellen.	120
Abbildung 39:	Die Bindung von rekombinantem La wt beziehungsweise La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A auf verschiedenen Zellen.	121
Abbildung 40:	Die Bindung von humanem La Protein auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit humanen unbehandelten, apoptotischen oder nekrotischen HeLa Zellen.	123
Abbildung 41:	Quantifizierung von humanem La Protein auf murinen A9 Zellen nach Kokultivierung mit humanen unbehandelten, apoptotischen oder nekrotischen HeLa Zellen.	126
Abbildung 42:	UV-Spektren der La Proteine.	127
Abbildung 43:	UV-Spektren der La Proteine mit und ohne Nukleinsäureverdau.	129
Abbildung 44:	Immunoblotanalysen zur Untersuchung der ssRNS-, dsRNS- und DNS-RNS-Hybridbindung durch La wt und dessen Cysteinmutanten.	131
Abbildung 45:	TNF α Sekretion aktivierter slanDCs nach 20 stündiger Kultivierung in An- und Abwesenheit von La wt beziehungsweise La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A.	133
Abbildung 46:	TNF α Sekretion von slanDCs eines repräsentativen Spenders nach Kultivierung in Anwesenheit von La wt ohne und mit vorheriger Inkubation in verschiedenen Seren.	136
Abbildung 47:	Schematische Darstellung der redoxabhängigen Antigenerkennung durch den <i>anti</i> -La mAK 312B für La wt.	140
Abbildung 48:	Schematische Darstellung zur Oxidation der Cysteinmutanten und deren Erkennung durch den <i>anti</i> -La mAK 312B.	141
Abbildung 49:	Schematische Darstellung der redoxabhängigen Antigenerkennung durch den <i>anti</i> -La mAK 7B6 in Zellen.	143
Abbildung 50:	Schematische Darstellung der sich ändernden Nukleinsäurebindung durch das La Protein.	146
Abbildung 51:	Das Prinzip eines potentiellen LPS-Sensorsystems basierend auf einer rezeptorinduzierten, zytoplasmatischen EGFP-La wt Anreicherung.	151
Abbildung 52:	Schematische Darstellung eines Modells zur Entstehung einer Immunantwort durch das La Protein und Autoantikörper.	157

VI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifizierung von Autoimmunkrankheiten (angelehnt an Janeway 2002, [1]).	2
Tabelle 2:	Nukleäre Fluoreszenzfärbemuster von Hep-2 Zellen mit deren korrelierenden Autoantigenen und den assoziierten Autoimmunkrankheiten (adaptiert nach [12]).	6
Tabelle 3:	Eigenschaften der wichtigsten <i>anti-La</i> mAK.	20
Tabelle 4:	Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 5:	Verwendete Geräte	26
Tabelle 6:	Computerprogramme & <i>Analysesoftware</i>	27
Tabelle 7:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 8:	Zusammensetzung von Lösungen und Puffern	30
Tabelle 9:	Verwendete Enzyme und Enzympuffer	32
Tabelle 10:	Verwendete <i>Kit</i> -Systeme und deren Bezugsquellen	32
Tabelle 11:	Verwendete Molekulargewichtsmarker und deren Bezugsquellen	33
Tabelle 12:	Verwendete Vektoren und deren Bezugsquellen	33
Tabelle 13:	Verwendete Primer für Sequenzierungen zur Kontrolle von Klonierungsereignissen	35
Tabelle 14:	Verwendete Oligonukleotide und Oligonukleotidprimer für die Amplifikation von La Proteinfragmenten und Generierung der La Cysteinmutanten durch PCR	35
Tabelle 15:	Verwendete Antikörper und deren Bezugsquellen	35
Tabelle 18:	Genotyp des verwendeten <i>Escherichia coli</i> Bakterienstammes	38
Tabelle 19:	Verwendete Grundmedien	38
Tabelle 20:	Verwendete Medienzusätze	38
Tabelle 21:	Zusammensetzung verschiedener Kultivierungsmedien	39
Tabelle 22:	Zusammensetzung SDS-Gele	53
Tabelle 23:	Verdünnungsstufen für den TNF α -Standard.	61
Tabelle 24:	Stimuli zur Induktion von intrazellulärem Sauerstoffstress.	67
Tabelle 25:	Zusätze für die La Protein bedingte slanDC-Aktivierung.	72
Tabelle 26:	Oligonukleotide zur Erzeugung eines dsDNS-Fragmentes von La zum Austausch des Cysteins an Position 18 in ein Alanin; unterstrichen sind die Nukleotide, die das Alanin an Position 18 codieren	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 27:	PCR-Primer für die Generierung des LaC_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A Fragmentes; unterstrichen sind die Nukleotide, die die Alanine an Position 232 und 245 codieren	74
Tabelle 28:	Resultate der Klonierungsexperimente; pET28a-La Plasmide für die bakterielle Expression der rekombinanten La Proteine in <i>E. coli</i> BL 21	74
Tabelle 29:	Konzentrationen und mittlere Ausbeuten der Reinigungen der verschiedenen La Proteine und La Fragmente	78
Tabelle 30:	Plasmide der EGFP-La Fusionsproteine im lentiviralen Vektor p6NST70 zur Erzeugung stabiler Zelllinien	96
Tabelle 31:	Sekundärstrukturanteile und Helikalität von La wt und der Monocysteinmutante La_C ₁₈ A. Die Daten wurden mit Hilfe des Auswertalgorithmuses CDSSTR (<i>modification of variable selection method</i>) erhoben, sowie unter Verwendung der Referenzdatenbank 4 für Proteinanalysen im Wellenlängenbereich von 190 – 240 nm.	106
Tabelle 32:	Sekundärstrukturanteile und Helikalität der Doppelcysteinmutante La_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A und der Tripelcysteinmutante La_C ₁₈ A_C ₂₃₂ A_C ₂₄₅ A. Die Daten wurden mit Hilfe der CDSSTR Methode erhoben, sowie unter Verwendung der Referenzdatenbank 4 für Proteinanalysen im Wellenlängenbereich von 190 – 240 nm.	106
Tabelle 33:	Resultate der Homologiesuche zur La wt Aminosäuresequenz in der NCBI-Datenbank	X

VII. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Diese Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät beziehungsweise dem Universitäts-KrebsCenter (UCC) des Carl Gustav Carus Universitätsklinikums der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. M. Bachmann, sowie von Prof. Dr. K.-H. van Pée angefertigt.

Ort, Datum

Irene Michalk